

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. **PCT/JP99/02045**

RECEIVED

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/53, C12N15/29, C12N9/02, C12P17/04, C07K1/22, C12N5/14, A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/53, C12N15/29, C12N9/02, C12P17/04, C07K1/22, C12N5/14, A01H5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | JP, 7-501686, A (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization), 23 February, 1995 (23. 02. 95) & WO, 9302195, A1 & AU, 9223316, A & EP, 599868, A1 & NZ, 243594, A | 1-17 |
| X | ESAKA, M. et al., "Molecular cloning and nucleotide sequence of full-length cDNA for ascorbate oxidase from cultured pumpkin cells", Eur. J. Biochem. (1990) Vol. 191, No. 3 p.537-541 | 1-17 |
| X | SHAHAR, T. et al., "The tomato 66.3-kD polyphenoloxidase gene: molecular identification and developmental expression" The Plant Cell (1992) Vol. 4, No. 2 p.135-147 | 1-17 |
| X | JOY, R.W. et al., "Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of <i>Phytolacca americana</i> ", Plant Physiol. (1995) Vol. 107, No. 4 p.1083-1089 | 1-17 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family |
|---|--|

Date of the actual completion of the international search
7 July, 1999 (07. 07. 99)

Date of mailing of the international search report
21 July, 1999 (21. 07. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

| | | |
|---|---|--|
| (51) 国際特許分類6 C12N 15/53, 15/29, 9/02, C12P 17/04, C07K 1/22, C12N 5/14, A01H 5/00 | A1 | (11) 国際公開番号 WO99/54478 (43) 国際公開日 1999年10月28日(28.10.99) |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP99/02045 (22) 国際出願日 1999年4月16日(16.04.99) (30) 優先権データ 特願平10/107296 1998年4月17日(17.04.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) サントリー株式会社(SUNTORY LIMITED)[JP/JP] 〒530-8203 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 榊原圭子(SAKAKIBARA, Keiko)[JP/JP] 〒617-0002 京都府向日市寺戸町西田中瀬3-1-327 Kyoto, (JP) 福井祐子(FUKUI, Yuuko)[JP/JP] 〒618-0014 大阪府三島郡島本町水無瀬2-8-2-907 Osaka, (JP) 田中良和(TANAKA, Yoshikazu)[JP/JP] 〒520-0246 滋賀県大津市仰木の里2-7-4 Shiga, (JP) 久住高章(KUSUMI, Takaaki)[JP/JP] 〒564-0073 大阪府吹田市山手町2-12-21-402 Osaka, (JP) 水谷正子(MIZUTANI, Masako)[JP/JP] 〒615-8086 京都府京都市西京区桂乾町53-60 Kyoto, (JP) | (74) 代理人 中山 亨(NAKAYAMA, Toru)[JP/JP] 〒981-3202 宮城県仙台市泉区北高森2-1-305 Miyagi, (JP) 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CA, CN, IL, JP, NZ, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書 | |
| (54)Title: GENE ENCODING PROTEIN HAVING AURONE SYNTHESIZING ACTIVITY (54)発明の名称 オーロン合成活性を有する蛋白質をコードする遺伝子 (57) Abstract A protein having an aurone synthase activity relating to the flower colors of <i>Antirrhinum majus</i> , etc., a gene, in particular, cDNA encoding the same and utilization thereof. By transferring this gene into a plant lacking chalcone isomerase, etc. and expressing it therein, the flower of the plant can be made yellow. | | |

例えば金魚草などの花の色に関与するオーロン合成酵素活性を有する蛋白質及びそれをコードする遺伝子、特に cDNA、及びその用途を提供する。この遺伝子を、カルコンイソメラーゼなどの欠損植物に導入して発現せしめることにより、その植物の花に黄色を付与することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

| | | | | | | | |
|----|--------------|----|---------|----|----------------|----|------------|
| AE | アラブ首長国連邦 | DM | ドミニカ | KZ | カザフスタン | RU | ロシア |
| AL | アルバニア | EE | エストニア | LC | セントルシア | SD | スーダン |
| AM | アルメニア | ES | スペイン | LI | リヒテンシュタイン | SE | スウェーデン |
| AT | オーストリア | FI | フィンランド | LK | スリ・ランカ | SG | シンガポール |
| AU | オーストラリア | FR | フランス | LR | リベリア | SI | スロヴェニア |
| AZ | アゼルバイジャン | GA | ガボン | LS | レソト | SK | スロヴァキア |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GB | 英国 | LT | リトアニア | SL | シエラ・レオネ |
| BB | バルバドス | GE | グルジア | LU | ルクセンブルグ | SN | セネガル |
| BE | ベルギー | GR | ギリシャ | LV | ラトヴィア | SZ | スワジランド |
| BF | ブルキナ・ファソ | GH | ガーナ | MA | モロッコ | TD | チャード |
| BG | ブルガリア | GM | ガンビア | MC | モナコ | TG | トーゴ |
| BJ | ベナン | GN | ギニア | MD | モルドヴァ | TJ | タジキスタン |
| BR | ブラジル | GW | ギニア・ビサウ | MG | マダガスカル | TZ | タンザニア |
| BY | ベラルーシ | GR | ギリシャ | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア | TM | トルクメニスタン |
| CA | カナダ | HR | クロアチア | | 共和国 | TR | トルコ |
| CF | 中央アフリカ | HU | ハンガリー | ML | マリ | TT | トリニダード・トバゴ |
| CG | コンゴ | ID | インドネシア | MN | モンゴル | UA | ウクライナ |
| CH | スイス | IE | アイルランド | MR | モーリタニア | UG | ウガンダ |
| CI | コートジボワール | IL | イスラエル | MW | マラウイ | US | 米国 |
| CM | カメルーン | IN | インド | MX | メキシコ | UZ | ウズベキスタン |
| CN | 中国 | IS | アイスランド | NE | ニジェール | VN | ヴェトナム |
| CR | コスタ・リカ | IT | イタリア | NL | オランダ | YU | ユーゴスラビア |
| CU | キューバ | JP | 日本 | NO | ノルウェー | ZA | 南アフリカ共和国 |
| CY | キプロス | KE | ケニア | NZ | ニュージーランド | ZW | ジンバブエ |
| CZ | チェッコ | KG | キルギスタン | PL | ポーランド | | |
| DE | ドイツ | KP | 北朝鮮 | PT | ポルトガル | | |
| DK | デンマーク | KR | 韓国 | RO | ルーマニア | | |

明 細 書

オーロン合成活性を有する蛋白質をコードする遺伝子

発明の分野

本発明は、カルコン類を基質としてオーロン類を合成する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子及びその利用に関するものである。更に詳しくは、カルコン類を基質としてオーロン類を合成する活性を有するポリフェノールオキシダーゼをコードする遺伝子及びその利用に関するものである。更に詳しくは、例えばカルコン類を基質としてオーロン類を合成する活性を有する金魚草由来の蛋白質をコードする遺伝子及びその利用に関するものである。

背景技術

花の色のうち、橙、赤、紫、青は主にアントシアニンと呼ばれるフラボノイドに由来する。黄色は、カロチノイド、ベタレインといったフラボノイド以外の化合物に由来することが多いが、一部の植物の黄色はフラボノイドに由来する。たとえば、金魚草、スターチス、アサガオ、ダリア、ムギワラギク、キクイモ、コスモスの一部の品種にはオーロン類に分類される化合物が花卉中に存在することが知られている（斉藤、バイオホルティ 1、49-57、1990）。

オーロン類としては、4',6-ジヒドロキシオーロン、4,4',6-トリヒドロキシオーロン、オーレウシジン、スルフレチン、ブラックテアチン等が知られており、金魚草にはオーレウシジンとブラックテアチンが、スターチスにはオーレウシジンが、アサガオにはオーレウシジンが、ダリアにはスルフレチンが、ムギワラギクにはブラックテアチンが、キクイモにはスルフレチンが含まれている。

また、キク科のコレオプシス属、ヒマワリ属、ティトニア属、ジニア属、ビギュエラ属、ツツジ科のウアッキニウム属、カヤツリグサ科のカヤツリグサ属、マメ科のアカシア属、プテロカルプス属、soja属、アカネ科コンロンカ属の一部にもオーロン類が植物体中に含まれることが知られている (The flavonoids, edited by J. B. Harbone, 1988, Chapman & Hall, 340-342)。

アントシアニンの生合成経路はよく研究されているが、オーロンの生合成に関しては、その構造から4',6-ジヒドロキシオーロンが2',4,4'-トリヒドロキシカルコンから合成されることが示唆され、その反応に関してはパーオキシダーゼが関わっているともいわれている (Rathmel and Bendall, Biochem. J. 127, 125-132, 1972) が、植物の花弁抽出液などを用いてオーロン類の生合成反応を明瞭に測定した例もなく、植物花弁中でどのような反応が起こっているのかを明らかにした報告もない。また、オーロン類の合成に関わる酵素を精製したという報告もない。

発明の開示

そこで、本発明者らは、オーロン類の生合成系を解明し、植物、特にその花の色を制御する手段を提供しようとするものである。

発明者らはオーロン類を含む金魚草花弁の粗抽出液を用いてカルコン類からオーロン類を合成する反応を測定するアッセイ方法確立した。この際生じるオーロン類は、従来考えられていた4'6-ジヒドロキシオーロンではなく、オーレウシジンであり、今回測定できた反応はいままで知られていないものであった。また、このアッセイ方法を用いて金魚草の花弁からカルコン類を基質としてオーロン類 (オーレウシジン) を合成する酵素 (オーレウシジンシンターゼ) を電気泳動的に単一なバンドにまで精製した。この純粋な標品を

用いてこの酵素の生化学的性質を明らかにした。また、この酵素の部分アミノ酸配列をも決定した。このアミノ酸配列に基づいて、金魚草の花弁由来のcDNAライブラリーからカルコン類を基質としてオーロン類を合成するオーロン合成酵素の遺伝子を得た。

なお、カルコン類としては、テトラヒドロキシカルコン、ペンタヒドロキシカルコン、プテイン、2',4,4'-トリヒドロキシカルコン等が知られている。

一方、得られた遺伝子は、ポリフェノールオキシダーゼの活性中心である銅の結合領域において相同性を有していた。そこで、ポリフェノールオキシダーゼのひとつとして知られているチロシナーゼについてカルコン類からオーロン類を合成する活性を有しているかどうか確認を行ったところ、チロシナーゼもオーロン類を合成する活性を有していることが明らかになった。

従って本発明は、カルコン類を基質としてオーロン類を合成する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を提供する。さらには、カルコン類を基質としてオーロン類を合成する活性を有するポリフェノールオキシダーゼをコードする遺伝子を提供する。さらには、配列番号：2に示すアミノ酸配列を有するカルコン類を基質としてオーロン類を合成する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を提供する。本発明はまた、上記の遺伝子を含んでなるベクターを提供する。

本発明はさらに、上記ベクターにより形質転換された宿主を提供する。この宿主は、微生物、植物細胞、動物細胞等の細胞であってもよく、また植物体であってもよい。

本発明はまた、上記細胞を培養し、又は上記植物を栽培することの特徴とするオーロン合成酵素、例えばオーレウシジンシンターゼの生成方法を提供する。生成した酵素は採取することもでき、また

植物体内で色の色調の調節のために機能させることもできる。この場合、植物体内に生成した酵素によりオーロン類が合成され、このオーロン類が植物体、例えば花の色を調製する。

従って、本発明はまた、カルコン類を基質としてオーロン類を合成する活性を有する酵素遺伝子例えばオーレウシジンシンターゼ遺伝子を植物又は植物細胞に導入し、該遺伝子を発現せしめ、生成した酵素により植物体内でオーロン類を合成することを特徴とする植物の花色の調節方法を提供する。本発明はまた、そのようにして花色が調節された植物をも提供する。

本発明はまた、前記の酵素蛋白質を基質色素であるカルコン類に作用させることを特徴とするオーロン類の合成方法を提供する。

本発明はまた、前記遺伝子にコードされている酵素蛋白質を提供する。

図面の簡単な説明

図 1 は、オーロン類及びカルコン類の構造式を示す。

図 2 は、オーロンの生合成経路を示す。

図 3 は、SYP8-17 を用いた黄色金魚草各器官におけるノザン解析結果を示す。

図 4 は、SYP8-17 を用いた黄色金魚草花卉の各発達段階におけるノザン解析結果を示す。

petal stage1: つぼみ花卉長さ 1 センチまで

petal stage2: つぼみ花卉長さ 1 - 1.5 センチ

petal stage3: つぼみ花卉長さ 1.5 - 2.0 センチ

petal stage4: つぼみ花卉長さ 2.0 - 2.5 センチ

petal stage5: つぼみ花卉長さ 2.5 - 3.0 センチ

petal stage6: 開花した花卉 3.0 センチ以上

図5は、SYP8-17を用いた黄色、ピンク色、白色の各金魚草花卉におけるノザン解析結果を示す。

図6は、オーロン合成酵素SYP-8に対する抗体（抗SYP-8）及びその他の参照抗体（抗band A及び抗 β -ガラクトシダーゼ）添加によるオーロン合成酵素の活性阻害様式を示すグラフである。

図7は、抗SYP8-IgG-Sepharose 4B 添加時に上清中に残存するSYP8蛋白量を示している。

発明の実施の形態

まず、黄色の金魚草の花弁から、各種クロマトグラフィー法によりオーレウシジンシンターゼを精製する。次に、常法に従ってオーレウシジンシンターゼの部分アミノ酸配列を解析し、それらのアミノ酸配列に対する合成オリゴヌクレオチドを作製する。

一方、同じ金魚草の花弁よりPoly A+RNAを精製し、常法によりcDNAライブラリーを作成する。

黄色の金魚草花弁のcDNAを鋳型に、前述の合成ヌクレオチドを用いてPCRを行い、オーレウシジンシンターゼに特異的なDNA断片を取得する。このDNA断片をベクターにサブクローニングし、プラスミドを作製する。

前述のcDNAライブラリーを前記プラスミドに含まれる挿入DNAを用いてスクリーニングし、クローンを得る。そして、このクローンから得られるプラスミドを分離し、塩基配列を決定する。

酵素活性を有する蛋白質は、その酵素活性に必須の領域と、酵素活性のために必須でない領域を有し、必須でない領域が1又は複数のアミノ酸の除去（欠失）、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されてもその酵素活性が維持されることが知られている。従って、本発明は、配列番号：2に示すアミノ酸配列を有する

蛋白質のみならず、配列番号：2に示すアミノ酸配列において、1個～複数個のアミノ酸配列の除去もしくは欠失、付加、及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されているアミノ酸配列を有し、且つカルコン類を基質としてオーロン類を合成する活性を維持している蛋白質、及び該蛋白質をコードする遺伝子も本発明に含まれる。

さらに、同一の酵素活性を有する蛋白質がアレル変異により異なるアミノ酸配列を有する場合があることが知られている。さらにまた、同一又は同等の酵素活性を有する酵素が多数の種にわたって分布しており、それらの酵素が高いアミノ酸配列の相同性を有することが知られている。そして、これらの蛋白質をコードする遺伝子は、本発明の遺伝子とのハイブリダイゼーションにより選択することが可能である。従って本発明は、配列番号：1に示す塩基配列を有する核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、且つカルコン類を基質としてオーロン類を合成する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子、及び該遺伝子によりコードされている蛋白質をも包含する。

配列番号：1に記載の塩基配列を有する核酸とハイブリダイズし、且つカルコン類を基質としてオーロン類を合成する酵素活性を有する蛋白質をコードする遺伝子としては、配列番号：2に記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子を人工的に修飾したものでもよく、また天然由来の遺伝子でもよい。天然由来の遺伝子としては、オーロン合成酵素を有する植物、例えば金魚草、スターチス、アサガオ、ダリア、ムギワラギク、キクイモ等から得られるcDNA又はゲノムDNAが挙げられる。ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーの程度は、例えば5×SSC 50℃、好ましくは2×SSC 50℃、より好ましくは0.2×SSC 50℃である。

酵素活性を有する蛋白質の生来のアミノ酸配列に対して、高い配列同一性 (identity) を有するアミノ酸配列を有する蛋白質は、生来の蛋白質と同様の酵素活性を有する場合が多いことはよく知られている。従って本発明は、配列番号：2 に示すアミノ酸配列に対して、55%以上、好ましくは、60%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、そして特に90%以上のアミノ酸配列の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、且つカルコン類を基質としてオーロン類を合成する活性を有する蛋白質、及びそれをコードする遺伝子をも包含する。

同等の酵素活性を有する複数の酵素は共通のエピトープを有する場合が多いことが知られている。従って本発明は、オーロン合成活性を有する上記種々の蛋白質、特に配列番号：2 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質に対する抗体と特異的に結合し、且つカルコン類を基質としてオーロン類を合成する酵素活性を有する蛋白質、及びそれをコードする遺伝子をも包含する。

本発明の配列番号：2 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする遺伝子は、cDNA又はゲノム DNAとして、金魚草から得ることができる。cDNAのクローニング方法は実施例8～10に具体的に記載されている。ゲノム DNAを得るには、金魚草から常法に従ってゲノム DNAライブラリーを作製し、それを前記cDNA又はその断片により常法に従ってスクリーニングすることにより得られる。

本発明の、配列番号：2 に示すアミノ酸配列に対して修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする遺伝子は、配列番号：2 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA、例えばcDNAの塩基配列を、部位特定変異誘導、PCR 法等、遺伝子进行操作するため常法に従って修飾することにより作製することができる。

配列番号：1 に記載の塩基配列を有する核酸とハイブリダイズし

、且つカルコン類を基質としてオーロン類を合成する酵素活性を有する遺伝子の内、天然由来の遺伝子は、オーロン合成酵素活性を有する蛋白質を産生し得る植物から常法に従ってcDNAライブラリー又はゲノム DNAライブラリーを作製し、これらのライブラリーを、例えば配列番号：1に示す塩基配列を有するcDNA又はその断片をプローブとして用いて、スクリーニングすることにより得られる。この際のハイブリダイゼーション条件としては、前記の条件を用いることができる。

また、金魚草より得られたオーロン合成酵素がポリフェノールオキシダーゼの一種であったことより、本発明者らは、他のポリフェノールオキシダーゼも、カルコン類からオーロン類を合成する活性を有していると考え、ポリフェノールオキシダーゼであるアカパンカビ由来でチロシナーゼとして市販されている酵素がオーロン合成活性を有するかどうか検討した。その結果、チロシナーゼがオーロン合成活性を有することが判明した。このことより、ポリフェノールオキシダーゼ活性を有する酵素には、カルコン類を基質としてオーロン類を合成する活性があることが明らかになった。

ポリフェノールオキシダーゼ活性を有する酵素の生理的役割は、いまだに明らかにされてはいないが、主にカテコールオキシダーゼ（酵素番号；1.10.3.1）、ラッカーゼ（酵素番号；1.10.3.2）、チロシナーゼ（酵素番号；1.14.18.1）の3種類に分類され、基質に対する特異性により異なった酵素番号で分類されている。いずれも酵素の反応中心が銅である銅酵素であり、蛋白質の高次構造等が基質特異性の違いをもたらすと考えられている。

このように、ポリフェノールオキシダーゼには、銅との結合領域にあたる保存領域が存在することから、この領域のアミノ酸配列をもとにしたプライマーを作製し、PCR 法等の定法に従い、ポリフェ

ノールオキシダーゼ遺伝子を得ることができ (Plant Physiol, vol. 107, p1083-1089, 1995, Plant Physiol, vol. 109, p525-531, 1995)、このようにして得られた遺伝子からオーロン類を合成する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を得ることができる。

本発明はまた、カルコン類を基質としてオーロン類を合成する活性を有する上記の蛋白質の製造方法を提供する。この方法は、前記の蛋白質をコードする DNAを含んで成るベクターを宿主に導入し、そして該宿主を培養し又は成育せしめ、そして所望により前記蛋白質を採取することを特徴とする。宿主としては宿主細胞でもよく、また植物等の生物体であってもよい。宿主細胞としては、原核細胞、特に細菌細胞、例えば大腸菌 (*Escherichia coli*)、バシルス (*Bacillus*) 属細菌、例えばバシルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、バシルス・ブレビス (*Bacillus brevis*) 等、下等真核生物、例えば真菌類、例えば酵母、例えばサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属酵母、例えばサッカロミセス・セレビシエー (*Saccharomyces cerevisiae*)、あるいは糸状菌、例えばアスペルギルス (*Aspergillus*) 属糸状菌、例えばアスペルギルス・オリゼー (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 等が挙げられる。

さらに、高等真核生物細胞宿主として、昆虫細胞、例えばカイコの細胞、動物細胞、例えば CHO細胞、ヒト培養細胞、例えば HeLa細胞等が挙げられる。

本発明の遺伝子はまた、生物体、例えば動物、植物等において発現せしめることができる。植物での発現については、さらに具体的に後記する。

本発明の DNAを含んで成るベクター、特に発現ベクターは発現制御領域を含有し、発現制御領域は宿主細胞に依存する。例えば、細

菌発現ベクターのプロモーターとしては、trcプロモーター、tacプロモーター、lacプロモーター、T7プロモーター等を使用することができ、酵母発現ベクターのプロモーターとしては、例えば解糖系酵素遺伝子のプロモーター、例えばグリセロアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター、ガラクトキナーゼプロモーター等を使用することができ、また、動物細胞用発現ベクターのプロモーターとしては、ウイルスプロモーターを使用することができる。

培養物から、カルコン類を基質としてオーロン類を合成する活性を有する蛋白質を採取するには、液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等、蛋白質の単離、精製に用いられる常用手段を用いることができる。アフィニティークロマトグラフィーは、本発明のオーロン合成酵素活性を有する蛋白質に対する抗体、例えば抗血清又はモノクローナル抗体との特異的結合を利用して行うことができる。

本発明のオーロン合成酵素活性を有する蛋白質に対する抗血清（ポリクローナル抗体）は、本発明の蛋白質、例えば実施例4において得られる蛋白質を、常用のアジュバントと共に動物、例えばウサギに対して免疫し、次に該動物から血清を得ることにより製造される。モノクローナル抗体は、常法に従って、例えば本発明の蛋白質により、動物、例えばマウスを免疫し、このマウスから得られるBリンパ球、例えば脾臓細胞をマウス等の脊髓腫細胞と融合せしめることによりハイブリドーマを得、これを培養することにより製造することができる。

現在の技術水準をもってすれば、さらに、このcDNAを植物たとえばペチュニア、バラ、カーネーション、キク、トレニア、バーベナ、ガーベラ、タバコ、イチゴ、トルコギキョウ、リンドウ、トレニア、グラジオラス、チューリップなどに、構成的なあるいは誘導型

のプロモーターの制御下に連結し、アグロバクテリウムを用いるシステムあるいはパーティクルガン、エレクトロポレーションを用いるシステムで導入すれば花卉などでオーロン合成酵素遺伝子を発現させることも可能である。

オーロン合成酵素が発現した花卉などではオーロン類が合成され、花卉の色が黄色になることが予想される。このようにして得られた植物は、従来の品種には存在しない新しい色の花を提供することができる。また、黄色の品種のある植物の中には、カロチノイドを含む植物種（キクやバラ）、あるいはベタレインを含む植物種（サボテン）があるが、これらの黄色とオーロン類の黄色は色調が異なるため、すでに黄色の品種のある植物種の色幅拡大にも有用である。

金魚草で黄色の花を持つものはオーロン合成酵素が存在すると共にカルコンイソメラーゼの酵素活性が欠損している場合がある。カルコンイソメラーゼはオーロン合成酵素と競争的に働くので、カルコンイソメラーゼが存在するとテトラヒドロキシカルコンからナリンゲニンが生じ、これが最終的にアントシアニンやフラボンになるからである。従って、オーロン合成酵素遺伝子を植物で発現させオーロン類を生産させるには、その植物は好ましくはカルコンイソメラーゼを欠損していることが望ましい。

一般に植物遺伝子は人為的にその活性を抑制することが可能であり、特にフラボノイド合成に関わる遺伝子を抑制した例は多く知られている。遺伝子の発現を人為的に抑制するにはアンチセンス法とコサプレッション法があるが、フラボノイド合成系の遺伝子はいずれの方法でも抑制が可能であることがわかっている（van der Krolら、Nature（1988）333, 866-869、Napoliら、Plant Cell（1990）2, 279-289）。同様にしてカルコンイソメラーゼ遺伝子の発現を抑制

することは可能である。

カルコンイソメラーゼの遺伝子は既に複数の植物種から得られている。例えばペチュニア、アルファルファ、金魚草、リンゴ、インゲンマメ、ブドウ (Holton et al. Plant Cell (1995), 7, 1071-1083) である。これらのカルコンイソメラーゼのアミノ酸配列を比較すると配列は種を越えてよく保存されている。フラボノイド合成に関わるある遺伝子をクローニングするには他の植物由来のその遺伝子をプローブにすれば容易に得られることを多くの例が示している。あるいは既知の遺伝子あるいはアミノ酸配列を比較して保存された領域を用いてPCR によってもクローニングできる。したがって、カルコンイソメラーゼ遺伝子はどの植物種からでも得ることができる。(Gutterson, Hort. Sci., vol. 30, p964~p966, 1995)。

また、フラバノン 3-ヒドロキシダーゼあるいはジヒドロフラボノール 4-リダクターゼの遺伝子発現を抑制する事によっても同様の効果が期待できる。これらの酵素遺伝子も多くの植物種から得られている (Gong et. al, Plant. Mol. Biol., 35, 915-927, 1997) ので、カルコンイソメラーゼの場合と同様な方法を使用する事によりどの植物種からも得る事ができる。

したがって、ある植物種でオーロン類に由来する黄色の花を持つ品種を育種するには、花卉でオーロン合成酵素遺伝子を発現させればよい。好ましくは、カルコンイソメラーゼ遺伝子の発現を抑制し、かつオーロン合成酵素遺伝子を発現させればよい。この場合、これらの遺伝子の発現調節に用いるプロモーターとしては構成的なものでも花卉特異的なものでもよい。これらの技術はさらに好ましくはオーロン類に糖を付加する糖転移酵素遺伝子も併せてその植物へ導入すれば、安定な黄色い花が得られる。これらは現在の技術水準を持ってすれば可能である。

また、ダリアや金魚草ではアントシアニンとオーロン類が共存した場合に花色が褐色になることが知られている。アントシアニンを花で生産している植物にオーロン合成酵素を導入することにより、褐色の花を育種することも可能である。このような花も新しい花の色として産業上重要であろう。

実施例

以下に実施例を示し、発明を詳細に述べる。

実施例 1. テトラヒドロキシカルコンの調製

ナリンゲニン 4 g に 50% (v/w) 水酸化カリウムを 20 ml 加え、完全に溶解した。この溶液を 100 °C で 90 秒間保持した後に、直ちに溶液を 300 ml の氷水で希釈冷却することにより反応を停止した。次にドラフト内でこの溶液に 6N 塩酸を加え、pH を 3 以下とし沈殿を生じさせた。生じた黄色沈殿を濾別し、最少量のエタノールに溶解し、氷冷しながら 400 ml の冷水を少しづつ加えた。一晩放置後、8000 回転、30 分間の遠心分離により得られた沈殿を水に再懸濁して凍結乾燥した。凍結乾燥後の粗テトラヒドロキシカルコン (THC) の重量は 2.7 g であった。

粗 THC を最少量のメタノールに溶解し、分取用逆相高速液体クロマトグラフィーにて THC を精製した。島久社の YMC D-ODS-5 S-5 12 0A (2.0 cm x 25 cm) を用い、40 % (v/v) アセトニトリル、0.03% (v/v) トリフルオロ酢酸水溶液で、4.5 ml/分の流速で展開した。THC は約 25 分、ナリンゲニンは約 29 分に溶出された。THC 画分を集めて凍結乾燥した。同一条件下で再クロマトグラフィーを一回行い、精製 THC とした。

実施例 2. オーレウシジンの調製

金魚草品種 バタフライイエローの花弁 290g を液体窒素中で粉碎し 2L の 0.1% TFA を含む 50% アセトニトリルに一晩浸漬した。珪藻土ろ

過し、ろ液を減圧濃縮後、HP-20 で精製した。黄色色素画分を濃縮し分取HPLCに供した。島久社のYMC D-ODS-5 S-5 120A (2.0 cm x 25 cm) を用いA 溶液に水、B 溶液に0.1%TFA, 50% アセトニトリルを用いてB20%からB60%までの直線濃度勾配で120 分のグラジエント条件でクロマトを行った。この結果、ブラックテアチン-6- グルコシドは40分に、オーレウシジン-6- グルコシドは53分に、テトラヒドロキシカルコン-4- グルコシドは100 分に溶出した。得られたオーレウシジン-6- グルコシドを β - グルコシダーゼで加水分解しオーレウシジンを得た。

実施例 3. オーロン合成酵素の活性測定方法

1 M 酢酸ナトリウム緩衝液pH5.0 を 50 μ l、水で希釈した粗酵素液350 μ l にエタノール中での366 nmでの吸光度が462 であるTHC を 5 μ l 加えることにより反応を開始した。30℃で1 時間反応をさせた後、1%(v/v) のTFA を含む90%(v/v)アセトニトリル水溶液 100 μ l を加えて反応を停止した後、HPLCにて活性を測定した。粗酵素液としては、後述の実施例 4 に述べる各精製ステップでの粗酵素液を使用した。

カラムはYMC J' Sphere ODS M80 (4.6 x 150 mm) を使用し、流速は0.7 ml/ 分とした。溶媒A を0.1 % TFA 水溶液、溶媒B を0.1 % TFA を含む90% アセトニトリル水溶液とし、サンプルをカラムに注入後、最初の3 分はA:B=7:3 を保持し、次の10分で直線濃度勾配でA:B=6:4 にし、この濃度を5 分間保持し、次の1 分でA:B=7:3 とした後、この濃度を5 分間保った。この条件で、基質のTHC は約20.9 分に溶出される。反応産物としては約8.8 分に溶出される化合物が検出された。この化合物は後で述べるようにオーレウシジンであった。

この反応によってTHC からオーレウシジンが生じることがわかった

実施例 4. オーロン合成酵素の精製

1) 酵素の精製

金魚草の黄色く着色し始めた花および萼の間から白い花びらがのぞいているつぼみ 32175g を出発材料として酵素精製を行った。花約 600g につき氷冷した緩衝液 A (0.01M 酢酸ナトリウム、pH 5.0) 2400 ml、120g の Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) を加え、ワーリングブレンダーにて 1-1.5 分間破碎した。

破碎液を 4 °C で 8000 回転、15 分間、遠心分離し、得られた上清に硫酸アンモニウムを 60% 飽和になるように溶解し、攪拌溶解後放置した。4 °C で 8000 回転、15 分間、遠心分離し集めた沈殿を最小容量の緩衝液 A に懸濁し、緩衝液 A に対して透析した。透析内液を 4 °C で 8000 回転、15 分間、遠心分離し、その上清を硫安分画濃縮液とした。硫安分画濃縮液は SP-Sephadex C50 クロマトグラフィーを行うまで -20°C で凍結保存した。

2) SP-Sephadex C50

得られた硫安分画濃縮液は 3 回にわけ以下の操作を行った。透析後の硫安分画濃縮液の電気伝導度を測定し、必要に応じて電気伝導度が 4 °C で 0.8-1 mS となるように、氷冷した脱イオン水で濃縮液を希釈した。緩衝液 B (数 μ M の THC を含有する緩衝液 A) にて十分平衡化した SP-Sephadex C50 カラム (6 cm \times 25.5 cm; 約 0.7 L) に、硫安分画濃縮液を負荷した。負荷後、緩衝液 B にてカラムを十分洗浄した。緩衝液 B (2.0 L) と、0.6 M NaCl を含有する緩衝液 B (2.0 L) との間の直線濃度勾配によりカラムを洗浄しながら、23 mL ずつ分画した。活性画分 (約 1200 mL) を集め、濾過滅菌し、Con A Sepharose クロマトグラフィーを行うまで 4 °C で保存した。

3) ConA Sepharose

ConA Sepharoseクロマトグラフィーは画分A (1100 mL に374,000 U を含む) と画分B (2900 mL に831,000 U を含む) の2回に分けおこなった。画分A に MnCl_2 と CaCl_2 を各々1 mMとなるように溶解し、緩衝液 C (1 mM MnCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 0.5 M NaCl を含む緩衝液 B) にて平衡化したConA Sepharose (2 cm \times 12 cm; 約40 mL) に負荷した。負荷後、約0.3 L の緩衝液 Cにてカラムを洗浄した。カラム素通りおよび洗浄画分 (300 mL) には、負荷前のそれぞれおよそ50000 U づつ (もとの13%づつ) の活性が含まれていた。

洗浄後、緩衝液 C (250 mL) と、0.2 M メチル- α -D-グルコシド、0.2 M メチル- α -D-マンノピラノシドを含有する緩衝液 C (250 mL) との間の直線濃度勾配によりカラムを洗浄しながら、4 mL ずつ分画し、活性画分 (計78 mL) を集めた。活性画分を緩衝液 D (5 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 5.0), 0.3 mM CaCl_2 、3-6 μ M THC) に対して十分透析した。洗浄画分の活性は2回目のクロマトグラフィー時に残りの画分B とあわせて再度クロマトグラフィーを行った。

残りの活性画分B に MnCl_2 と CaCl_2 を各々1 mMとなるように溶解し、緩衝液 Cにて平衡化したConA Sepharose (3.6 cm \times 12 cm; 約120 mL) に負荷した。負荷後、約0.3 L の緩衝液 Cにてカラムを洗浄した。カラム素通りおよび洗浄画分 (300 mL) には、活性がほとんど含まれていなかった。洗浄後、緩衝液 C (350 mL) と、0.2 M メチル- α -D-グルコシド、0.2 M メチル- α -D-マンノピラノシドを含有する緩衝液 C (350 mL) との間の直線濃度勾配によりカラムを洗浄しながら、8 mL ずつ分画し、活性画分 (計150 mL) を集めた。活性画分を緩衝液 Dに対して十分透析した後、先のサンプルとあわせ活性画分 (計250mL) を得た。

4) Gigapite

緩衝液Dにて平衡化したGigapite カラム（生化学工業：2 cm x 16 cm, 50 mL のオープンカラム）に透析内液（250 mL）を負荷した。サンプル負荷後、カラムを緩衝液 D（250 mL）で洗浄した。緩衝液 D（200 mL）と、0.5 M リン酸カリウム緩衝液（pH 5.0）（200 mL）との間の直線濃度勾配によりカラムを洗浄しながら、4 mL ずつ分画し、活性画分（計120 mL）を集めた。

5) HiLoad 16/60 Superdex 75 pg FPLC

活性画分に {3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate} (CHAPS) を終濃度0.1 %に溶解し、アミコンPM10膜を用いて限外濾過を行い18 ml に濃縮した。濃縮した活性画分は6回に分け以下の操作を行った。

FPLCシステムを用いて、氷冷したHiLoad 16/60 Superdex 75 pg カラムを0.07% CHAPS, 0.15 M NaClを含有する緩衝液 Bで平衡化し、流速0.5ml/min で溶出し、2ml ずつ分画した。活性画分（計63 mL）を集めた。

6) SP-Sepharose FF FPLC

得られた活性画分を緩衝液 E（0.07% CHAPS を含有する緩衝液 B）に対して4 °Cで十分透析した。FPLCシステムを用い2回に分け、以下のクロマトグラフィーを行った。氷冷したSP-Sepharose FF カラム（1 x 16 cm）を緩衝液 Eで平衡化した。カラムにサンプルを負荷後、A 液として緩衝液E を、B 液として0.7M NaCl を含む緩衝液E を用いた。最初の30分で95% A 液、5% B液でカラムを洗浄し、その後120 分で55% A 液、45% B 液への直線濃度勾配を行い、その後10分、同じ条件で溶出した。流速0.5ml/min で、1.0 mlずつ分画した。活性画分（計27.8ml）を集め、濾過滅菌をして4 °Cで保存した。

7) Gigapiteカラムクロマトグラフィー

活性画分のうち22mlをGigapite (1 x 14 cm) FPLC にてさらに精製した。サンプル22 ml を 0.07%CHAPS を含む 0.005 Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 5.0) に対して4℃で一晩透析し、次の条件で FPLC を行い、活性と蛋白バンドの挙動の相関も観察した。A 液として 0.07% CHAPS, 0.3 mM CaCl_2 を含む0.005 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 5.0) を、B 液として0.07% CHAPS を含む0.5 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 5.0) を使用し、カラムとバッファーを氷冷して行った。

流速0.5ml/min で、100%A 液で30分間カラムを洗浄し、その後6秒で95% A 液、5% B液に、次の149 分54秒で20% A 液、80% B 液への直線濃度勾配を行い、その後155 分まで同じ条件で溶出し、1.0 mlずつ分画した。

クロマトグラムと活性測定結果より活性の動きと最も良好な相関が認められた40 kDaの蛋白質を含む画分を集めて一次構造解析に供した。

実施例 5. カラムクロマトグラフィー 3 種類における活性測定と SDS-PAGE

1) Superdex200 Smart system

サンプル50 μl をもちいてSuperdex200 Smart systemによる分画を行った。溶媒として 0.07% CHAPS、0.15 M NaClを含む0.01M 酢酸ナトリウム (pH 5.0) を用い、4℃で以下の操作を行った。流速40.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ で40.0 μl ずつ分画し、ゲル濾過クロマトグラフィーをおこなった。得られたサンプルについて活性測定とSDS-PAGEを行った。酵素活性は分子量43 kDa付近に溶出され、サンプルに含まれる蛋白質の中では、40 kDa蛋白質の挙動が活性の動きともっともよく相関していた。

2) Alkyl-Sepharose HR5/5 FPLC

サンプル250 μ l を0.01M 酢酸ナトリウム(pH 5.0)に対して4 $^{\circ}$ Cで一晩透析し、硫酸アンモニウムを終濃度2 M となるように溶解した。室温にてAlkyl-Sepharose HR5/5 FPLCを行った。A 液として2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を含む0.01M 酢酸ナトリウム(pH 5.0)を、B 液として0.01M 酢酸ナトリウム(pH 5.0)を用い、最初の10分は100% A液でカラムを洗浄後、次の50分でB 液100%への直線濃度勾配を行い、次の5 分まで同じ条件で溶出し、0.5 mlずつ分画した。

各フラクションのうち400 μ l をウルトラフリーC3GC(分画分子量10,000、ミリポア社)で40 μ l にまで濃縮し、そのうちの10 μ l をSDS-PAGEにて分析し、10 μ l を活性測定に用いた。サンプルに含まれる蛋白質の中では、40 kDaの挙動に活性の動きとの間に最も良好な相関が認められた。

3) Gigapite HR5/5 FPLC

サンプル300 μ l を0.07% CHAPS を含む0.005 M リン酸カリウム緩衝液(pH 5.0)に対して4 $^{\circ}$ Cで一晩透析した。次の条件で室温にてGigapite HR5/5 FPLC を行った。

A 液として 0.07% CHAPS, 0.3 mM CaCl_2 を含む0.005 M リン酸カリウム緩衝液(pH 5.0)を、B 液として0.07% CHAPS を含む0.5 M リン酸カリウム緩衝液(pH 5.0)を使用し、最初の5 分は、100% A液で、カラムを洗浄し、次の6 秒で80% A 液、20% B 液の、また次の44 分54秒で20%A液、80% B 液の直線濃度勾配を行い、0.5 mlずつ分画した。活性測定とSDS-PAGE電気泳動を、おこなった。サンプルに含まれる蛋白質の中では、40 kDaの挙動に活性の動きとの間に最も良好な相関が認められた。

以上Superdex200 Smart system、Alkyl-Sepharose FPLC及びGigapite FPLC におけるカラムクロマトグラフィーの結果、約40 kDaの

蛋白質がバンドの動きと活性の動きが良好な相関を示した。

実施例 6. オーロン合成酵素の性質

精製したオーロン合成酵素を用いて反応させると、THC からオペンタヒドロキシカルコンからもオーレウシジンの精製が確認できた。できた産物がオーレウシジンであることはHPLCによる分析により確認した。

この酵素の分子量はSDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動では40 kDa で、Superdex200 を用いたゲル濾過法では43kDa であることがわかった。このことからオーロン合成酵素はモノマーであることがわかった。1mM の一価の銅イオン、二価の銅イオン、二価の鉄イオン、三価の鉄イオンの存在下で酵素活性は90% 以上阻害された。また、ConAセファロースへ結合することより、本酵素は糖を含む酵素である可能性がある。また、過酸化水素を添加すると活性がやや上昇した。

THC を基質として反応したところ、オーレウシジンと思われる産物が生じたが、この産物を多量に集めて構造決定を行った。10 mM の過酸化水素を含む1 M 酢酸ナトリウム緩衝液pH5.0 を20 ml、酵素液を20 ml、水を58 ml、THC 10mg (0.5 ml) を混合し、30℃で3 時間半保持した。反応後、反応液をSep-pak C18 に吸着させ、メタノールで溶出した。これをエバポレーターで濃縮後、分取用HPLCで分離精製した。カラムはYMC D-ODS-5 S-5 120A (2.5 x 25 cm)を使用した。溶出は0.03% TFA を含む40 %アセトニトリル水溶液を用い、流速は4.5 ml/ 分とした。約17分で溶出されるピークを回収し、乾固したところ約4.9mg の生成物が得られた。¹H NMR、マススペクトルでその構造を決定したところ、この化合物はオーレウシジンであった。

実施例 7. オーロン合成酵素のアミノ酸配列の決定

得られたオーロン合成酵素標品約1nmol を、最終濃度2 %のSDS サンプル処理液を加え、非還元条件下で調製用電気泳動装置(バイオフォーシス、アトー社)により電気泳動を行い、分子量41000のポリペプチドを回収した。このポリペプチドをC4カラム(Dev elosil300C4-HG-5)を用いた逆相HPLCにて分離したところ、1つのピークが検出され、精製したオーロン合成酵素が純粋であることが確認できた。

このポリペプチドをリジルエンドペプチダーゼAP1により消化した。反応のための緩衝液は40 mM Tris-HCl (pH9.5)で0.01 %のTween 20 と2M尿素を含んでいた。消化物をBakerbond ODS (4.6mm x 25 cm)カラムを用いた逆相HPLCにて分離精製した。すなわち、0.05 %トリフルオロ酢酸水溶液をA液、0.05 %トリフルオロ酢酸を含む80 %アセトニトリルをB液とした時、最初の5分は90%A液、10%B液とした。次の80分で100%B液への直線濃度勾配を行い、ペプチドを分離した。

精製できたペプチドを気相法ペプチドシーケンサーにて構造を決定した。決定した構造を以下に示す。

P5: (K)KLG YVYQDVEIP (配列番号: 3)

P8: (K)IVYRQMVSSAK (配列番号: 4)

P11: (K)TPQLFFGRPYRRGDQEF (配列番号: 5)

P4-5: (K)IIDFELPXPSTTMRVRRAAHLVDDAYIXK (配列番号: 6)

実施例 8. 金魚草花卉のcDNAライブラリーの作製

花卉のcDNAライブラリーの作製は以下の方法により作製した。黄色の金魚草の新鮮な開花直前の花卉5gからR. McGookin らのMethod in Molecular Biology vol.2 (Humana Press Inc.1984)に詳細に示されているチオシアン酸グアニジン/塩化セシウムを用いる方法でRNAを得、オリゴテックスdT30(日本ロシュ)を用いてPolyA+

RNA を精製した。このPolyA+RNA を用いて、cDNA synthesis Kit, Uni-XR vector kit (Stratagene)を用いて、 λ ZAPII(Stratagene) をベクターとして、cDNAライブラリーを作製した。作製方法はStratagene社が推奨する方法に従った。得られたライブラリーは 1.6×10^6 プラーク形成ユニット(pfu) から成っていた。

実施例 9. サブトラクション法による黄色の金魚草で発現している遺伝子の取得

サブトラクションは、ある組織や時期で特異的に発現している遺伝子を取得する方法の一つで、ここではPCR-Select™ cDNA Subtraction kit (Clontech社)を用いて推奨される方法で行った。黄色金魚草花卉由来cDNAをtester、ピンク色金魚草花卉由来mRNAをdriverとして使用した。最終的にPCR で増幅したDNA 断片をTAクローニングキット(Invitogen社)を用いて PCRII™ベクターにサブクローニングし、それぞれの塩基配列を決定した。

これらのうちSYP8と名付けた遺伝子がコードしていると考えられるアミノ酸配列を配列番号7に示した。

RQMVSSAKTPQLFFGRPYRRGDQEFPGVGSIELVPHGMIHLWTGSENTPYGENMGAFY
STARDPIFFAHHSNVDRMWSIWKTLLGGPRRTDLTDPDFLDASFVFCDENAEMVRVKVRDC
LDGKKLG (配列番号: 7)

このアミノ酸配列のうち、N-末端の25個のアミノ酸から成る配列及びC-末端の4個のアミノ酸から成る配列は実施例7で得られた配列P5、P8、P11と一致した。すなわち、この遺伝子断片はオーロン合成酵素をコードしていることがわかった。

実施例 10. 完全長オーロン合成酵素遺伝子の取得

先に述べた金魚草cDNAライブラリーをDNA断片SYP8を用いてスクリーニングした。ライブラリーのスクリーニングはノンラジオシステムDNA 検出キット(ベーリンガー社)を用いる方法で行った。約

20万プラークをスクリーニングした結果、多数のポジティブシグナルが得られた。この内から20プラークをランダムに選択し、2次スクリーニングで純粋なプラークを単離し、これらのうち最長のクローンSYP8-17の塩基配列を決定した。

塩基配列は、オリゴヌクレオチドプライマーを合成し、DNA Sequencer model 373A (ABI 社) を用いて決定した。塩基配列とその推定アミノ酸配列を配列番号1に示した。このアミノ酸配列を用いてデータベース検索をしたところこの遺伝子はポリフェノールオキシダーゼ遺伝子 (GenBank Accession NO.L29451, D45385, Z11702) などと弱い相同性を示したが、この遺伝子は新規であることがわかった。なお、ポリフェノールオキシダーゼと相同性を有する主な領域は、ポリフェノールオキシダーゼの活性中心である銅への結合領域であった。

実施例 1 1. オーロン合成酵素遺伝子の発現様式

SYP8-17 を用いて、黄色金魚草の各器官、花卉の各発達段階におけるノザン解析を行った。また、黄色、ピンク色、白色の各金魚草花卉におけるノザン解析を行った。方法はMolecular Cloning (Sambrookら、Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989) によった。結果を図3、図4及び図5に示す。オーロン合成酵素遺伝子は花卉で特異的に発現し、しかも、花卉での発現はオーロン類の生合成と並行して発現していた。また、黄色金魚草の花弁に比べオーロン合成活性のごく弱いあるいは検出されなかったピンクと白の金魚草の花弁ではオーロン合成酵素遺伝子のmRNAの蓄積は少ないかほとんど見られなかった。これらの結果は、得られた遺伝子がオーロン類の合成にかかわっていることを示唆している。

実施例 1 2. バーベナcDNAライブラリーの作製

バーベナ品種花手鞠バイオレット (サントリー) の新鮮なつぼみ

5gから先に述べたようにmRNAを精製し、cDNAライブラリーを作製した。cDNAライブラリーの作製は実施例8で述べたとおりである。得られたライブラリーは 0.8×10^6 プラーク形成ユニット(pfu)から成っていた。

実施例 13. バーベナカルコンイソメラーゼcDNAのクローニング

既に配列の知られている高等植物由来カルコンイソメラーゼのアミノ酸配列を比較し、よく保存されていると思われる領域のアミノ酸配列Phe-Val/Ile-Lys-Phe-Thr-Ala-Ile 配列(配列番号: 8)、Lys-Trp-Lys-Gly-Lys-Thr/Pro 配列(配列番号: 9)、His-Ala-Val-Cys-Asn-Glu (配列番号: 10)の逆配列をもとに以下のプライマーを合成した。

CHI-F1: 5'-TT(T,C) (A,G)TN AA(A,G) TT(T,C) ACN GCN AT-3'

(配列番号: 11)

CHI-F2: 5'-AA(A,G) TGG AA(A,G) GGN AA(A,G) (A,C)C-3'

(配列番号: 12)

CHI-R2: 5'-(A,G)TG NGC NAC (A,G)CA (A,G)TT (T,C)TC-3'

(配列番号: 13)

先に合成したCHI-F1とCHI-R2、またはCHI-F2とCHI-R2のプライマーの組み合わせで96℃で2分反応させた後、96℃、1分、42℃、1.5分、72℃、3分の反応を30回繰り返し、最後に72℃で7分反応させた。得られたPCR産物を鋳型として再度同条件でPCRを行ったところCHI-F1とCHI-R2プライマーの組み合わせでは約200bpの、CHI-F2とCHI-R2プライマーの組み合わせでは約800, 600, 400及び150bpのPCR産物が増幅された。

得られたPCR産物はTAクローニングキット(Invitrogen社)を用いてPCR^{II}™ベクターにサブクローニングした。サブクローニングしたDNA断片の塩基配列をDNA Sequencer model 373A(ABI社)を

用いて決定した。CHI-F1とCHI-R2、及びCHI-F2とCHI-R2プライマーの各プライマーの組み合わせで得られたPCR産物は、それぞれ222bp及び159bpで長さの異なる同じ配列であった。そこから推定されるアミノ酸配列は他の高等植物由来のカルコンイソメラーゼと高い相同性を示した。

花手鞠カルコンイソメラーゼ222bpを含んだPCRII™ベクターをEcoRIで消化し得られた約230bpのフラグメントを鋳型にしてCHI-F1とCHI-R2プライマーを用いてPCRをおこなった。増幅された約230bpのPCR産物を鋳型に、PCR法を用いて95℃で2分反応させた後、95℃、1分、42℃、1分、72℃、4分の反応を25回繰り返し、最後に72℃で7分反応させ、ジゴキシゲニンでラベルしスクリーニングの際のプロープとして使用した。花手鞠cDNAライブラリーからのスクリーニングはノンラジオシステムDNA検出キット（ベーリンガー社）を用いて推奨される方法で行った。

同様な方法を用いれば他の植物のカルコンイソメラーゼの遺伝子も得ることができる。

実施例 14. SYP8 抗原の調製

実施例 9 に記載の SYP8 遺伝子は、The QIAexpressionist kit (QIAGEN社) を用いて大腸菌体内で発現させ、精製した。オーロン合成酵素の精製標品の分子量が40～43 kDaであることより、成熟型蛋白はN末端および、C末端のペプチドが切除されていることが予想された。

そこで配列番号2に示したアミノ酸配列のうち61残基目のグリシン残基から416残基目のリジン残基までの領域を発現させるべく、QESYP8-5'、QESYP8-3'プライマーを合成した。

QESYP8-5' : 5' - AA GGA TCC GGC CCT ATC GCC - 3'

(配列番号 14)

QESYP8-3' : 5' - GGG TTC GAA GAA TTC ATC TCT G - 3'

(配列番号 15)

QESYP8-5' プライマーにはBamHI サイト、QESYP8-3' プライマーにはHindIII サイトを導入した。合成したQESYP8-5', QESYP8-3' プライマー各30pmol, SYP8-17 遺伝子 1ng, 1 x cloned pfu DNA polymerase buffer(stratagene)、200 μ M dNTPs、cloned pfu DNA polymerase 5unit (stratagene)の総量100 μ l からなる反応液をもちいてPCR 反応をおこなった。反応は94℃で45秒間保持した後、94℃、45秒、50℃、45秒、72℃、4 分間からなる反応を25サイクル行い、最後に72℃で10分間保持した。得られたPCR 産物をTAクローニングキット (Invitorgen社) を用いてpCR2.1・TOP0™ベクターにサブクローニングし、プラスミド p CR・QESYP8とした。p CR・QESYP8をBamHI, HindIIIで処理して得られる約1 kbのDNA 断片を同じくBamHI, HindIIIで処理したpQE30 ベクター (QIAGEN社) に連結し、プラスミドpQESYP8 を構築した。pQESYP8 を大腸菌M15[pRep4]に形質転換した。大腸菌内でのSYP8蛋白の発現および精製は製造者らの推奨する方法に従った。得られた精製蛋白は、SDS-PAGEによる分析で少量の共雑蛋白が認められたので、以下のとおりさらに精製を行った。蛋白溶液をCentriprep10(アミコン社)を用いて約1 mlに濃縮し、蒸留水で透析したのち、凍結乾燥品とした。SDS処理を行った後、Biophoresis (アトー社、4.5 %濃縮ゲル、10%分離ゲル、15mA、分画0.8ml)を用いて、共雑蛋白を分離した。得られた最終精製標品をウルトラフリー10(ミリポア社)を用いて濃縮すると同時に、0.1%CHAPS を含むPBS 緩衝液(1リットル中に8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na₂HPO₄, 0.24g KH₂PO₄ を溶解し、塩酸でpHを7.4 に調製する)に置換した。最終精製標品の蛋白濃度は1.0mg/mlであった。

実施例 15. SYP8 抗体カラムの作製

実施例 14 で調製した SYP8 抗原 (1.0mg/ml) を 4 回にわたって各 0.2mg、ウサギ二羽に免疫した。初回の免疫はフロイント完全アジュバンドを用いて行った。追加免疫時にはフロイント不完全アジュバンドを用いて行った。追加免疫は初回免疫後 14 日目、42 日目、56 日目に行った。方法は、新生化学実験講座 12 巻にしたがった。初回免疫後 52 日目、66 日目、70 日目に採血し、得られた血液を 37℃ で 30 分保持した後、4℃ 一晚静置した。凝集した血餅を取り除き、抗血清を得た。抗血清は 0.85% NaCl で 2 倍に希釈した後、半量の氷冷したフリーゲン (ヘキストジャパン社) を加え、激しく攪拌した後、1500 回転で 5 分間遠心することで、脱脂し、上澄み液を以後、抗血清として使用した。

脱脂した抗 SYP8 抗血清 (約 45ml) を等量の 0.15M NaCl 溶液にて希釈し、33% 飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、8000 rpm で 30 分間遠心分離した。沈殿を緩衝液 A (0.05M Tris-HCl, pH8.6、0.15M NaCl) にて透析した。透析内液を Hi Trap ProteinA カラム (1ml) に供し、IgG 画分を精製した。緩衝液 A にて平衡化した Hi Trap ProteinA カラムに、透析したサンプルを負荷し、カラムを緩衝液 A で洗浄した後緩衝液 B (0.05M クエン酸緩衝液、pH5.3、0.15M NaCl)、緩衝液 C (0.05M 酢酸緩衝液、pH4.3、0.15M NaCl)、緩衝液 D (0.05M グリシン緩衝液、pH2.3、0.15M NaCl) を用いて順次溶出した。紫外吸収法およびイムノドットプロット法により IgG が緩衝液 C、緩衝液 D の両画分にあることを確認し、これらを混合して IgG 画分とした。これらの蛋白総量は約 70mg であった。得られた IgG 画分は 0.1M NaHCO₃、0.5M NaCl にて透析後、セントリコン 10 (アミコン社) にて濃縮し約 2mg/ml とした。

CNBr-activated Sepharose 4B、4.5g を 45ml の 1mM HCl に懸濁し、ブフナーロート上で 1mM HCl、500 ml にて洗浄した。濃縮した

IgG 溶液に洗浄した樹脂を少しずつ加え懸濁し、4 °Cで一晩振とうしIgG を固定化した。ブフナーロート上で吸引ろ過することにより樹脂を回収し、0.2M Tris-HCl 緩衝液、pH8.5、30mlに再懸濁し4 °Cで二晩振とうすることにより、樹脂上に残存する活性基を不活性化した。次に樹脂を0.2M酢酸緩衝液 pH5.0、Tris-HCl緩衝液、pH8.5、および0.01M リン酸カリウム緩衝液、pH7.8、0.2M NaCl で順次洗浄した。コントロールとして抗bandA IgG, 抗 β -ガラクトシダーゼIgG もそれぞれ同様にしてSepharose4B に固定化した。この固定化したSepharose4B を実施例16でIgG-Sepharose 4B懸濁液（抗SYP8、抗bandA、抗 β ガラクトシダーゼ）として使用した。なお、樹脂単位重量当たりの反応IgG 重量は、3種類ともほぼ同じに設定した。固定化収率は90~100 %であった。

実施例 16. 免疫沈降実験

一定量の酵素液に、牛血清アルブミン水溶液（終濃度0.1 %）および実施例15で作製したIgG-Sepharose 4B懸濁液（抗SYP8、抗bandA、抗 β ガラクトシダーゼ；樹脂相：液相=2：1 v/v）を0, 200, 500, 815 μ l それぞれ加え、0.01M リン酸カリウム緩衝液、pH7.8、0.2M NaCl にて全量を1 ml とした。混合液を4 °Cで24時間振とうし、13000rpm, 20分間遠心した後、上清を用いてオーロン合成酵素活性を測定した。

オーロン合成酵素活性は、上清に最終濃度0.1% CHAPS, 5mM H₂O₂, 0.1M クエン酸緩衝液、pH 5.4になるよう加えて、総量を395 μ l にし、30°Cで15分間保持した後、THC(A366=600になるようエタノールで溶解したもの)5 μ l を加えて反応を開始した。30°Cで60分間反応させた後、10% TFA, 90% アセトニトリルを100 μ l 加えて反応を停止した。反応液を実施例3で述べたようにHPLCで分析することにより活性を測定した。

図 6 に示したように、抗 SYP8-IgG-Sepharose 4B を用いた時には、上清中の酵素活性が、抗 SYP8-IgG-Sepharose 4B 添加量に依存して、減少した。コントロールとして抗 bandA-IgG-Sepharose 4B、抗 β ガラクトシダーゼ-IgG-Sepharose 4B を加えた場合はオーロン合成酵素活性には変化がなかった。また、沈殿として回収した樹脂を 0.01M リン酸カリウム緩衝液、0.2M NaCl で洗浄し、オーロン合成酵素活性を測定したところ、抗 SYP8-IgG-Sepharose 4B にのみ、強いオーロン合成活性が見られた。

上清を SDS-PAGE、ウエスタンブロッティングにて分析したところ、図 7 に示したとおりオーロン合成酵素のシグナルは抗 SYP8-IgG-Sepharose 4B の添加量に依存して減少した。一方、コントロールとして抗 bandA-IgG-Sepharose 4B を用いた同様の実験ではオーロン合成酵素遺伝子のシグナルは抗 bandA-IgG-Sepharose 4B の添加量に関わらず、一定であった。

これらの結果より、SYP8 遺伝子がオーロン合成酵素をコードしていることが確認された。なお、図 7 にて抗 SYP8-IgG-Sepharose 4B の添加量に伴って約 80kDa のシグナルが検出されるが、実験までの樹脂の保存時間に伴ってこのシグナルが増大することから、これは Sepharose 4B 樹脂よりはずれた IgG に由来するものと考えられる。

実施例 17.

実施例 10 で述べたように、アミノ酸レベルで、オーロン合成酵素はポリフェノールオキシダーゼと弱い相同性を示し、その相同性を有する主な領域は、銅への結合領域であった。よって、オーロン合成酵素もまた銅酵素であることが予想されたので、オーレウシンシンターゼの原子吸光分析を行った。測定装置として島津 AA-670 OF を使い、測定モードはファーンズ測定で 324.8nm の波長で行った。

1000ppm の銅標準液（和光純薬）を濃硝酸で1000倍希釈したものをを用いて検量線（検量範囲：0～9 ppb）を作成した。原子吸光分析では、共存する有機物質が測定を妨害することがあるため、本測定に先立ち、マッシュルームチロシナーゼ（銅イオンを含む酵素）を用い、0.1%CHAPS を含む酢酸バッファー中でも銅の原子吸光測定が可能であることをあらかじめ確認した。次にオーレウシジンシンターゼ純品（200 μ l）を0.1%CHAPS を含む酢酸バッファー（pH6.0）に対して十分透析した。いくつかの既知量の標準蛋白質をSDS-PAGEにて分析し、得られた銀染色のバンドの濃さをイメージスキャナーで数値化し、バンドの濃さからタンパク量を求めるための検量線を作成した。オーレウシジンシンターゼ純品の一部を同一条件下でSDS-PAGEにかけ、その銀染色のバンドの濃さをイメージスキャナーで数値化し、すでに作成した検量線からタンパク濃度を見積もった。その100 μ lに濃硝酸（1.38N）を0.5 μ l加え、測定した結果、銅が検出された。よって、この酵素が銅酵素であることが明らかになった。

実施例 18. チロシナーゼのオーロン合成活性について

チロシナーゼ（Sigma社 catalog no. T7755 ; 0.04mg/ml, 10 μ L）、0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.5, 335 μ L）、9%CHAPS（20 μ L）、ミリQ水（20 μ L）を混合後、30℃で10分間インキュベートし、テトラヒドロキシカルコン（THC, 4.3mM in ethanol, 15 μ L）を加えて直ちに攪拌し、30℃で30分間反応させた。反応後、反応液に反応停止液（90%アセトニトリルを含む10%トリフルオロ酢酸水溶液）を100 μ L加えて反応を停止し、HPLC分析した。分析は、実施例3と同様に行った。コントロールにはチロシナーゼの代わりに水を用いた。

チロシナーゼを加えたものでは、基質のTHC が約15.9分に溶出し

、反応産物であるオーレウシジンが約12.5分に溶出した。一方、チロシナーゼの代わりに水を加えたものでは、基質のTHC は約16分に溶出されたが、オーレウシジンは溶出されなかった。

また、基質としてTHC の代わりにペンタヒドロキシカルコン (PHC)を、また緩衝液として0.116Mクエン酸リン酸ナトリウム緩衝液 (pH5.4)を用い、上と同じ条件下で反応させた。同様に、コントロールにはチロシナーゼの代わりに水を用いた。

チロシナーゼを加えたものでは、基質のPHC が約14.7分に溶出し反応産物であるオーレウシジンが約12.5分に生成した。一方、チロシナーゼの代わりに水を加えたものでは、基質のPHC は約14.6分に溶出されたが、オーレウシジンは検出されなかった。

従って、チロシナーゼもオーロンを合成する活性を有することが判明した。

産業上の利用可能性

以上に述べたように本発明において、テトラヒドロキシカルコンからオーロンの一種であるオーレウシジンを合成する反応を初めて測定し、その反応を触媒するオーレウシジンシンターゼを単離精製し、そのアミノ酸配列を決定し、その遺伝子をクローニングした。ここでは、酵素の起源としては金魚草を用いたが、他のオーロン類を含む植物からも同様な方法でオーロン類を合成する酵素を精製し、その遺伝子を得ることができる。

あるいは、同じ反応を触媒する酵素の遺伝子は互いに塩基配列が相同で、ハイブリダイズすることが知られているので、金魚草から得たcDNAをもとに他の起源のオーロン類を合成する酵素の遺伝子を得ることができる。

また、ポリフェノールオキシダーゼからも、カルコン類を基質と

してオーロン類を合成する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を得ることができる。

目的の遺伝子を植物に導入することは現在では広く行われており、本発明により、従来黄色い花を持たない植物種における、黄色い花の育種が可能となった。さらに黄色い花を持つ植物種においても、その色調を変えることができる。

活性を有する蛋白質。

1 2. 請求項 7 に記載の宿主を培養し、又は成育させ、そして該宿主からカルコン類を基質としてオーロン類を合成する活性を有する蛋白質を採取又は精製することを特徴とする、該蛋白質の製造方法。

1 3. カルコン類を基質としてオーロン類を合成する活性を有する蛋白質の採取又は精製方法において、請求項 1 0 又は 1 1 に記載の蛋白質に対する抗体との特異的な結合を利用することを特徴とする方法。

1 4. オーロンの合成方法であって、請求項 1 0 又は 1 1 に記載の蛋白質をカルコン類に作用せしめることを特徴とする方法。

1 5. 植物体内におけるオーロン類の合成方法であって、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子で植物又は植物細胞を形質転換し、該遺伝子を発現せしめ、そして生成した蛋白質により植物体内にオーロン類を合成することを特徴とする方法。

1 6. 請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子が導入されており、花色が調節された植物もしくはこれと同じ性質を有するその子孫又はそれらの組織。

1 7. 花色が黄色に調節された請求項 1 6 記載の植物もしくはこれと同じ性質を有するその子孫又はそれらの組織。

請 求 の 範 囲

1. カルコン類を基質としてオーロン類を合成する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子。
2. 前記蛋白質がポリフェノールオキシダーゼである請求項1記載の遺伝子。
3. 配列番号2記載のアミノ酸配列、あるいはそのアミノ酸配列に対して1個若しくは複数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加により修飾されたアミノ酸配列を有し、且つカルコン類を基質としてオーロン類を合成する活性を有する蛋白質をコードする請求項1又は2記載の遺伝子。
4. 配列番号1記載の塩基配列を有する核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができ、且つカルコン類を基質としてオーロン類を合成する活性を有する蛋白質をコードする請求項1又は2記載の遺伝子。
5. 配列番号2記載のアミノ酸配列に対して55%以上の配列同一性を有し、且つカルコン類を基質としてオーロン類を合成する活性を有する蛋白質をコードする請求項1又は2記載の遺伝子。
6. 請求項1～5のいずれか1項に記載の遺伝子を含んでなるベクター。
7. 請求項6に記載のベクターにより形質転換された宿主。
8. 前記宿主が微生物又は動物細胞である請求項7記載の宿主。
9. 前記宿主が植物細胞又は植物体である請求項7記載の宿主。
10. 請求項1～5のいずれか1項に記載の遺伝子によりコードされる蛋白質。
11. 請求項10に記載の蛋白質に対する抗体と特異的に結合することができ、且つカルコン類を基質としてオーロン類を合成する

Fig. 1

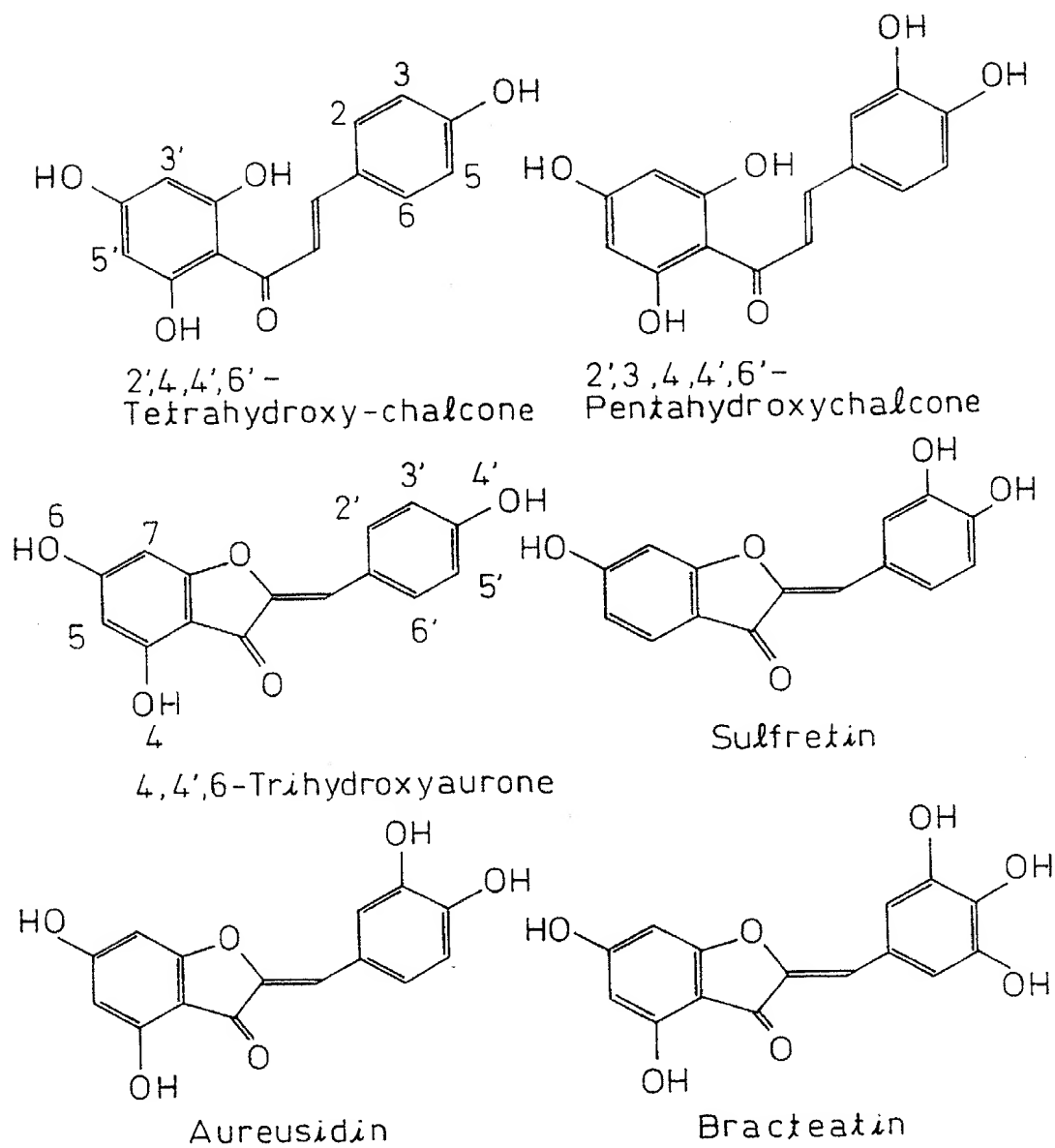


Fig. 2

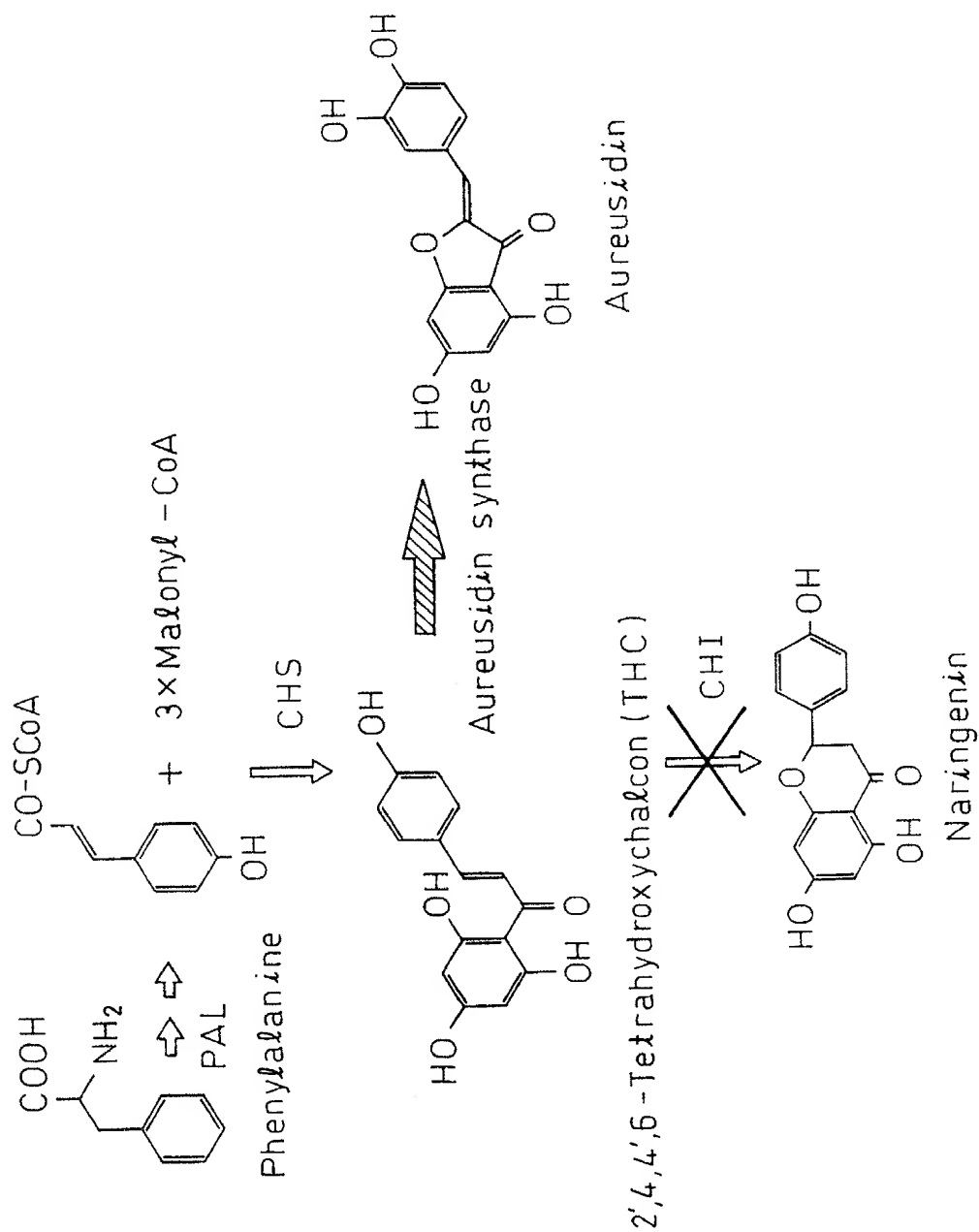


Fig. 3

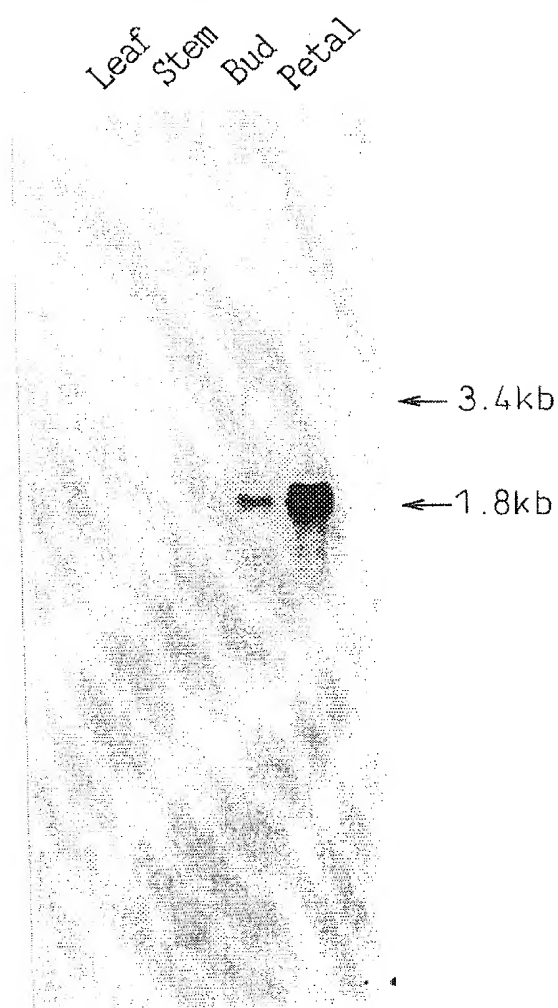


Fig. 4

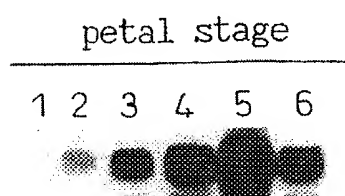


Fig.5

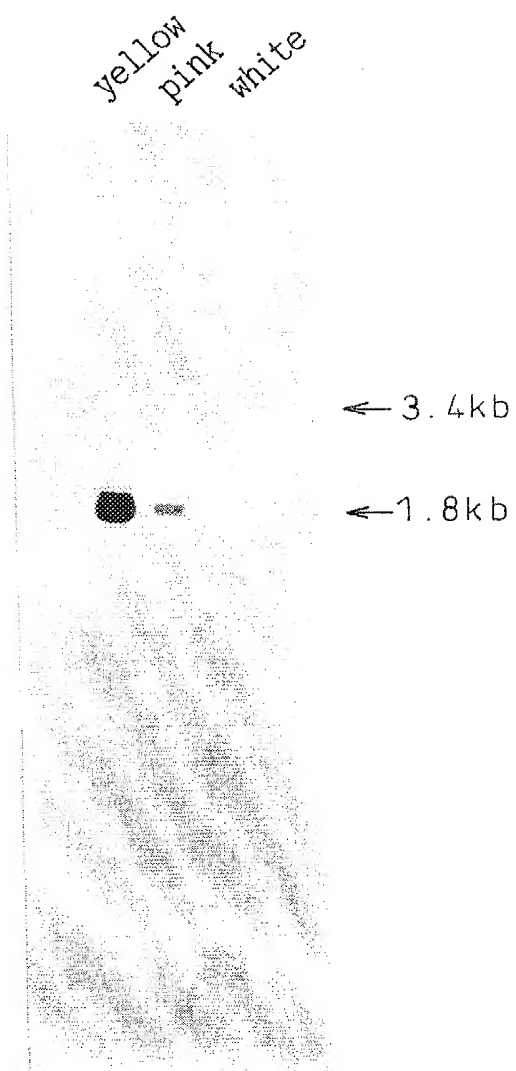


Fig. 6

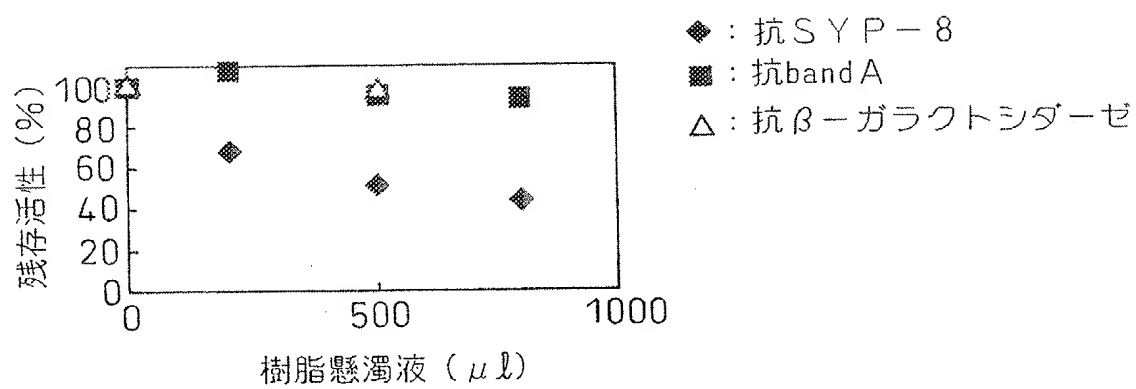
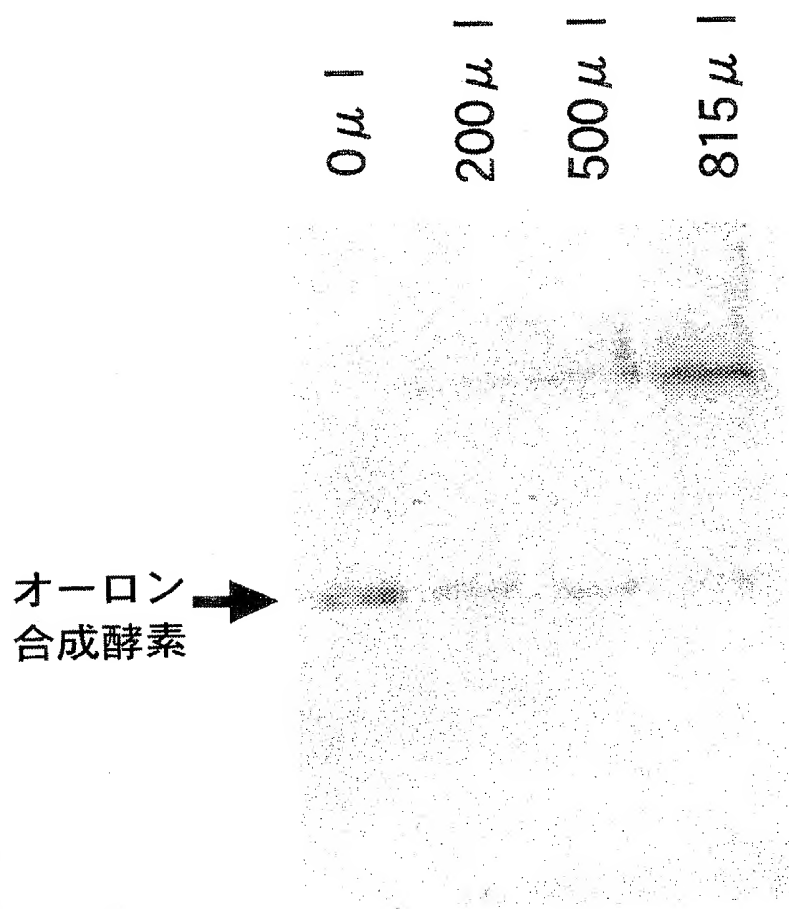


Fig. 7

抗SYP8-Sepharose 4B
添加量



SEQUENCE LISTING

<110> SUNTORY LIMITED

<120> Gene coding for protein having aurone synthesizing activity

<130> G837

<150> JP 10-107296

<151> 1998-04-17

<160> 15

<210> 1

<211> 1951

<212> DNA

<213> Antirrhinum majus

<220>

<221> CDS

<222> (96)...(1781)

<223> Nucleotide sequence coding for a protein having aurone synthesizing activity

<400> 1

aaattacatt gcttcctttg tcccaccttc caccaccaat atatacaact tcctcagcta 60

gttggtttatt atcaatcaaa taaaattatt tccca atg ttc aaa aat cct aat 113

Met Phe Lys Asn Pro Asn

1

5

atc cgc tat cac aaa cta tct tcc aaa tcc aat gac aac gat caa gaa 161

Ile Arg Tyr His Lys Leu Ser Ser Lys Ser Asn Asp Asn Asp Gln Glu

10

15

20

| | |
|---|-----|
| tcc tcc cat cgt tgt aag cac att cta tta ttt ata ata acc tta ttc | 209 |
| Ser Ser His Arg Cys Lys His Ile Leu Leu Phe Ile Ile Thr Leu Phe | |
| 25 30 35 | |
| cta ctt ata gtt ggc ctg tac atc gcc aac tct ctc gcc tat gcc cgg | 257 |
| Leu Leu Ile Val Gly Leu Tyr Ile Ala Asn Ser Leu Ala Tyr Ala Arg | |
| 40 45 50 | |
| ttt gcc tcg acc tca acc ggc cct atc gcc gcc cct gat gtc acc aaa | 305 |
| Phe Ala Ser Thr Ser Thr Gly Pro Ile Ala Ala Pro Asp Val Thr Lys | |
| 55 60 65 70 | |
| tgt ggt cag cca gac ttg cca cct ggc aca gcc cca ata aac tgt tgt | 353 |
| Cys Gly Gln Pro Asp Leu Pro Pro Gly Thr Ala Pro Ile Asn Cys Cys | |
| 75 80 85 | |
| ccc cca atc ccc gct aaa atc atc gat ttc gag cta cca cct ccc tcc | 401 |
| Pro Pro Ile Pro Ala Lys Ile Ile Asp Phe Glu Leu Pro Pro Pro Ser | |
| 90 95 100 | |
| act acc atg agg gtt cgc cgt gcg gct cat tta gtt gat gat gca tac | 449 |
| Thr Thr Met Arg Val Arg Arg Ala Ala His Leu Val Asp Asp Ala Tyr | |
| 105 110 115 | |
| att gcc aaa ttc aag aaa gcc gtt gag ctt atg cga gct cta cct gag | 497 |
| Ile Ala Lys Phe Lys Lys Ala Val Glu Leu Met Arg Ala Leu Pro Glu | |
| 120 125 130 | |
| gat gac cct cgt agc ttc aag caa caa gct aac gtc cat tgc gct tac | 545 |
| Asp Asp Pro Arg Ser Phe Lys Gln Gln Ala Asn Val His Cys Ala Tyr | |
| 135 140 145 150 | |
| tgc gcg ggg gcg tat aat caa gcc ggt ttc aca aac cta aag ctc caa | 593 |
| Cys Ala Gly Ala Tyr Asn Gln Ala Gly Phe Thr Asn Leu Lys Leu Gln | |
| 155 160 165 | |

| | |
|---|------|
| atc cac cga tct tgg ctt ttt ttc ccg ttc cat aga tat tat atc tac | 641 |
| Ile His Arg Ser Trp Leu Phe Phe Pro Phe His Arg Tyr Tyr Ile Tyr | |
| 170 175 180 | |
| ttt ttt gaa aga ata ttg gga aaa cta atc aat gat aca act ttt gct | 689 |
| Phe Phe Glu Arg Ile Leu Gly Lys Leu Ile Asn Asp Thr Thr Phe Ala | |
| 185 190 195 | |
| ctc cca ttt tgg aac tat gat tca cct ggt gga atg aca atc cca tca | 737 |
| Leu Pro Phe Trp Asn Tyr Asp Ser Pro Gly Gly Met Thr Ile Pro Ser | |
| 200 205 210 | |
| atg ttt att gat act aat tct tcg ctg tac gat agt tta cgg gac agt | 785 |
| Met Phe Ile Asp Thr Asn Ser Ser Leu Tyr Asp Ser Leu Arg Asp Ser | |
| 215 220 225 230 | |
| aat cat cag cca cca acc atc gta gac ttg aac tac gcc ttt tct gat | 833 |
| Asn His Gln Pro Pro Thr Ile Val Asp Leu Asn Tyr Ala Phe Ser Asp | |
| 235 240 245 | |
| tcc gac aat acc act act cct gaa gag caa atg att ata aac ctt aaa | 881 |
| Ser Asp Asn Thr Thr Thr Pro Glu Glu Gln Met Ile Ile Asn Leu Lys | |
| 250 255 260 | |
| att gtg tac aga caa atg gtg tcg agc gct aag act cca cag ctt ttc | 929 |
| Ile Val Tyr Arg Gln Met Val Ser Ser Ala Lys Thr Pro Gln Leu Phe | |
| 265 270 275 | |
| ttc ggc cgc cca tac cga cgt ggg gac caa gag ttt ccc ggg gtg ggg | 977 |
| Phe Gly Arg Pro Tyr Arg Arg Gly Asp Gln Glu Phe Pro Gly Val Gly | |
| 280 285 290 | |
| tcg att gag tta gtc cct cat ggc atg ata cat tta tgg acc ggt tct | 1025 |
| Ser Ile Glu Leu Val Pro His Gly Met Ile His Leu Trp Thr Gly Ser | |
| 295 300 305 310 | |

| | |
|---|------|
| gag aac acg ccc tat ggc gag aac atg ggg gct ttc tac tca acg gct | 1073 |
| Glu Asn Thr Pro Tyr Gly Glu Asn Met Gly Ala Phe Tyr Ser Thr Ala | |
| 315 320 325 | |
| aga gac ccg ata ttt ttt gct cat cat tcg aac gtc gat aga atg tgg | 1121 |
| Arg Asp Pro Ile Phe Phe Ala His His Ser Asn Val Asp Arg Met Trp | |
| 330 335 340 | |
| tcc ata tgg aag acc cta gga ggg ccg cgg agg acg gac tta aca gat | 1169 |
| Ser Ile Trp Lys Thr Leu Gly Gly Pro Arg Arg Thr Asp Leu Thr Asp | |
| 345 350 355 | |
| cca gat ttt ctt gat gcg tct ttc gtt ttt tat gac gaa aac gca gag | 1217 |
| Pro Asp Phe Leu Asp Ala Ser Phe Val Phe Tyr Asp Glu Asn Ala Glu | |
| 360 365 370 | |
| atg gtt cgg gtc aag gtt cgg gat tgc tta gat gaa aag aaa cta ggg | 1265 |
| Met Val Arg Val Lys Val Arg Asp Cys Leu Asp Glu Lys Lys Leu Gly | |
| 375 380 385 390 | |
| tac gtt tat caa gat gtg gag att ccg tgg ctc aac act cgt cca aca | 1313 |
| Tyr Val Tyr Gln Asp Val Glu Ile Pro Trp Leu Asn Thr Arg Pro Thr | |
| 395 400 405 | |
| cca aaa gtt tct ccg tct cta ctt aag aaa ttt cat aga aca aac act | 1361 |
| Pro Lys Val Ser Pro Ser Leu Leu Lys Lys Phe His Arg Thr Asn Thr | |
| 410 415 420 | |
| gcc aat ccg aga caa gtt ttt cct gcg ata ctt gac aga gtc tta aaa | 1409 |
| Ala Asn Pro Arg Gln Val Phe Pro Ala Ile Leu Asp Arg Val Leu Lys | |
| 425 430 435 | |
| gtt atc gtg acg agg ccg aag aaa act aga agt agg aaa gaa aag gac | 1457 |
| Val Ile Val Thr Arg Pro Lys Lys Thr Arg Ser Arg Lys Glu Lys Asp | |
| 440 445 450 | |

gag tta gaa gag att tta gtg att gaa ggg att gaa ctg gaa aga gac 1505
 Glu Leu Glu Glu Ile Leu Val Ile Glu Gly Ile Glu Leu Glu Arg Asp
 455 460 465 470
 cac ggg cac gta aaa ttc gac gtt tat att aat gct gac gaa gat gac 1553
 His Gly His Val Lys Phe Asp Val Tyr Ile Asn Ala Asp Glu Asp Asp
 475 480 485
 ctt gcg gtg att tcg ccg gag aat gct gag ttc gcc ggg agt ttc gtg 1601
 Leu Ala Val Ile Ser Pro Glu Asn Ala Glu Phe Ala Gly Ser Phe Val
 490 495 500
 agt ctg tgg cac aaa cct ata aag ggg aag agg aca aag acg cag tta 1649
 Ser Leu Trp His Lys Pro Ile Lys Gly Lys Arg Thr Lys Thr Gln Leu
 505 510 515
 tta aca ttg tcg att tgt gat att ttg gag gat ttg gat gct gac gaa 1697
 Leu Thr Leu Ser Ile Cys Asp Ile Leu Glu Asp Leu Asp Ala Asp Glu
 520 525 530
 gat gat tat gtg ttg gtc act ttg gtt ccg aga aac gcc gga gat gcg 1745
 Asp Asp Tyr Val Leu Val Thr Leu Val Pro Arg Asn Ala Gly Asp Ala
 535 540 545 550
 atc aag att cat aat gtc aag att gag ctt gat ggc taataaattc 1791
 Ile Lys Ile His Asn Val Lys Ile Glu Leu Asp Gly
 555 560 562
 tattgatttc tctcaacct acagttgatc attaccgat tgattattcc aataaaagta 1851
 tctcatgtac caatatcgat cgtattaatc gtaatacttt cagattttta tttatttaaa 1911
 agcagtttgta taaatgggtga aataaggatt actttttgag 1951
 <210 > 2
 <211 > 562
 <212 > PRT

<213 > Antirrhinum majus

<220 >

<223 > Amino acid sequence of a protein having aurone synth
esizing activity

<400 > 2

Met Phe Lys Asn Pro Asn Ile Arg Tyr His Lys Leu Ser Ser Lys Ser

1 5 10 15

Asn Asp Asn Asp Gln Glu Ser Ser His Arg Cys Lys His Ile Leu Leu

20 25 30

Phe Ile Ile Thr Leu Phe Leu Leu Ile Val Gly Leu Tyr Ile Ala Asn

35 40 45

Ser Leu Ala Tyr Ala Arg Phe Ala Ser Thr Ser Thr Gly Pro Ile Ala

50 55 60

Ala Pro Asp Val Thr Lys Cys Gly Gln Pro Asp Leu Pro Pro Gly Thr

65 70 75 80

Ala Pro Ile Asn Cys Cys Pro Pro Ile Pro Ala Lys Ile Ile Asp Phe

85 90 95

Glu Leu Pro Pro Pro Ser Thr Thr Met Arg Val Arg Arg Ala Ala His

100 105 110

Leu Val Asp Asp Ala Tyr Ile Ala Lys Phe Lys Lys Ala Val Glu Leu

115 120 125

Met Arg Ala Leu Pro Glu Asp Asp Pro Arg Ser Phe Lys Gln Gln Ala

130 135 140

Asn Val His Cys Ala Tyr Cys Ala Gly Ala Tyr Asn Gln Ala Gly Phe

145 150 155 160

Thr Asn Leu Lys Leu Gln Ile His Arg Ser Trp Leu Phe Phe Pro Phe

165 170 175

His Arg Tyr Tyr Ile Tyr Phe Phe Glu Arg Ile Leu Gly Lys Leu Ile
 180 185 190
 Asn Asp Thr Thr Phe Ala Leu Pro Phe Trp Asn Tyr Asp Ser Pro Gly
 195 200 205
 Gly Met Thr Ile Pro Ser Met Phe Ile Asp Thr Asn Ser Ser Leu Tyr
 210 215 220
 Asp Ser Leu Arg Asp Ser Asn His Gln Pro Pro Thr Ile Val Asp Leu
 225 230 235 240
 Asn Tyr Ala Phe Ser Asp Ser Asp Asn Thr Thr Thr Pro Glu Glu Gln
 245 250 255
 Met Ile Ile Asn Leu Lys Ile Val Tyr Arg Gln Met Val Ser Ser Ala
 260 265 270
 Lys Thr Pro Gln Leu Phe Phe Gly Arg Pro Tyr Arg Arg Gly Asp Gln
 275 280 285
 Glu Phe Pro Gly Val Gly Ser Ile Glu Leu Val Pro His Gly Met Ile
 290 295 300
 His Leu Trp Thr Gly Ser Glu Asn Thr Pro Tyr Gly Glu Asn Met Gly
 305 310 315 320
 Ala Phe Tyr Ser Thr Ala Arg Asp Pro Ile Phe Phe Ala His His Ser
 325 330 335
 Asn Val Asp Arg Met Trp Ser Ile Trp Lys Thr Leu Gly Gly Pro Arg
 340 345 350
 Arg Thr Asp Leu Thr Asp Pro Asp Phe Leu Asp Ala Ser Phe Val Phe
 355 360 365
 Tyr Asp Glu Asn Ala Glu Met Val Arg Val Lys Val Arg Asp Cys Leu
 370 375 380

Asp Glu Lys Lys Leu Gly Tyr Val Tyr Gln Asp Val Glu Ile Pro Trp
 385 390 395 400

Leu Asn Thr Arg Pro Thr Pro Lys Val Ser Pro Ser Leu Leu Lys Lys
 405 410 415

Phe His Arg Thr Asn Thr Ala Asn Pro Arg Gln Val Phe Pro Ala Ile
 420 425 430

Leu Asp Arg Val Leu Lys Val Ile Val Thr Arg Pro Lys Lys Thr Arg
 435 440 445

Ser Arg Lys Glu Lys Asp Glu Leu Glu Glu Ile Leu Val Ile Glu Gly
 450 455 460

Ile Glu Leu Glu Arg Asp His Gly His Val Lys Phe Asp Val Tyr Ile
 465 470 475 480

Asn Ala Asp Glu Asp Asp Leu Ala Val Ile Ser Pro Glu Asn Ala Glu
 485 490 495

Phe Ala Gly Ser Phe Val Ser Leu Trp His Lys Pro Ile Lys Gly Lys
 500 505 510

Arg Thr Lys Thr Gln Leu Leu Thr Leu Ser Ile Cys Asp Ile Leu Glu
 515 520 525

Asp Leu Asp Ala Asp Glu Asp Asp Tyr Val Leu Val Thr Leu Val Pro
 530 535 540

Arg Asn Ala Gly Asp Ala Ile Lys Ile His Asn Val Lys Ile Glu Leu
 545 550 555 560

Asp Gly

562

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213 > Antirrhinum majus

<220 >

<223 > Partial amino acid sequence of a protein having auro
ne synthesizing activity

<400 > 3

Lys Lys Leu Gly Tyr Val Tyr Gln Asp Val Glu Ile Pro

5

10

<210 > 4

<211 > 12

<212 > PRT

<213 > Antirrhinum majus

<220 >

<223 > Partial amino acid sequence of a protein having auro
ne synthesizing activity

<400 > 4

Lys Ile Val Tyr Arg Gln Met Val Ser Ser Ala Lys

5

10

<210 > 5

<211 > 18

<212 > PRT

<213 > Antirrhinum majus

<220 >

<223 > Partial amino acid sequence of a protein having auro
ne synthesizing activity

<400 > 5

Lys Thr Pro Gln Leu Phe Phe Gly Arg Pro Tyr Arg Arg Gly Asp Gln

5

10

15

Glu Phe

<210 > 6

<211 > 30

<212 > PRT

<213 > Antirrhinum majus

<220 >

<221 > UNSURE

<222 > (9)

<220 >

<221 > UNSURE

<222 > (29)

<223 > Partial amino acid sequence of a protein having auro
ne synthesizing activity

<400 > 6

Lys Ile Ile Asp Phe Glu Leu Pro Xaa Pro Ser Thr Thr Met Arg Val

5

10

15

Arg Arg Ala Ala His Leu Val Asp Asp Ala Tyr Ile Xaa Lys

20

25

30

<210 > 7

<211 > 125

<212 > PRT

<213 > Antirrhinum majus

<220 >

<223 > Partial amino acid sequence of a protein having auro
ne synthesizing activity

<400 > 7

Arg Gln Met Val Ser Ser Ala Lys Thr Pro Gln Leu Phe Phe Gly Arg

5

10

15

Pro Tyr Arg Arg Gly Asp Gln Glu Phe Pro Gly Val Gly Ser Ile Glu

20

25

30

Leu Val Pro His Gly Met Ile His Leu Trp Thr Gly Ser Glu Asn Thr

35

40

45

Pro Tyr Gly Glu Asn Met Gly Ala Phe Tyr Ser Thr Ala Arg Asp Pro

50

55

60

Ile Phe Phe Ala His His Ser Asn Val Asp Arg Met Trp Ser Ile Trp

65

70

75

80

Lys Thr Leu Gly Gly Pro Arg Arg Thr Asp Leu Thr Asp Pro Asp Phe

85

90

95

Leu Asp Ala Ser Phe Val Phe Cys Asp Glu Asn Ala Glu Met Val Arg

100

105

110

Val Lys Val Arg Asp Cys Leu Asp Gly Lys Lys Leu Gly

115

120

125

<210 > 8

<211 > 7

<212 > PRT

<213 > Artificial Sequence

<220 >

<221 >

<222 > (2)

<223 > Xaa is Val or Ile

<400 > 8

Phe Xaa Lys Phe Thr Ala Ile

5

<210 > 9
<211 > 6
<212 > PRT
<213 > Artificial Sequence
<220 >
<221 >
<222 > (6)
<223 > Xaa is Thr or Pro
<400 > 9

Lys Trp Lys Gly Lys Xaa

5

<210 > 10
<211 > 6
<212 > PRT
<213 > Artificial Sequence
<220 >
<221 >
<222 >
<223 >
<400 > 10

His Ala Val Cys Asn Glu

5

<210 > 11
<211 > 20
<212 > DNA
<213 > Artificial Sequence
<220 >

< 221 >

< 222 >

< 223 > Primer

< 400 > 11

ttyrtnaart tyacngcnat

20

< 210 > 12

< 211 > 17

< 212 > DNA

< 213 > Artificial Sequence

< 220 >

< 221 >

< 222 >

< 223 > Primer

< 400 > 12

aartggaarg gnaarmc

17

< 210 > 13

< 211 > 18

< 212 > DNA

< 213 > Artificial Sequence

< 220 >

< 221 >

< 222 >

< 223 > Primer

< 400 > 13

rtgngcnacr carttytc

18

< 210 > 14

< 211 > 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Primer

<400> 14

aaggatccgg ccctatcgcc

20

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Primer

<400> 15

gggttcgaag aattcatctc tg

22

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

| | | |
|---|---|---|
| (51) 国際特許分類6 C12N 15/53, 15/29, 9/02, C12P 17/04, C07K 1/22, C12N 5/14, A01H 5/00 | A1 | (11) 国際公開番号 WO99/54478 (43) 国際公開日 1999年10月28日(28.10.99) |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP99/02045 (22) 国際出願日 1999年4月16日(16.04.99) (30) 優先権データ 特願平10/107296 1998年4月17日(17.04.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) サントリー株式会社(SUNTORY LIMITED)[JP/JP] 〒530-8203 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 榊原圭子(SAKAKIBARA, Keiko)[JP/JP] 〒617-0002 京都府向日市寺戸町西田中瀬3-1-327 Kyoto, (JP) 福井祐子(FUKUI, Yuuko)[JP/JP] 〒618-0014 大阪府三島郡島本町水無瀬2-8-2-907 Osaka, (JP) 田中良和(TANAKA, Yoshikazu)[JP/JP] 〒520-0246 滋賀県大津市仰木の里2-7-4 Shiga, (JP) 久住高章(KUSUMI, Takaaki)[JP/JP] 〒564-0073 大阪府吹田市山手町2-12-21-402 Osaka, (JP) 水谷正子(MIZUTANI, Masako)[JP/JP] 〒615-8086 京都府京都市西京区桂乾町53-60 Kyoto, (JP) | (74) 代理人 中山 亨(NAKAYAMA, Toru)[JP/JP] 〒981-3202 宮城県仙台市泉区北高森2-1-305 Miyagi, (JP) 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CA, CN, IL, JP, NZ, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書 | |
| (54) Title: GENE ENCODING PROTEIN HAVING AURONE SYNTHESIZING ACTIVITY (54) 発明の名称 オーロン合成活性を有する蛋白質をコードする遺伝子 (57) Abstract A protein having an aurone synthase activity relating to the flower colors of <i>Antirrhinum majus</i> , etc., a gene, in particular, cDNA encoding the same and utilization thereof. By transferring this gene into a plant lacking chalcone isomerase, etc. and expressing it therein, the flower of the plant can be made yellow. | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02045

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/53, C12N15/29, C12N9/02, C12P17/04, C07K1/22, C12N5/14, A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/53, C12N15/29, C12N9/02, C12P17/04, C07K1/22, C12N5/14, A01H5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | JP, 7-501686, A (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization), 23 February, 1995 (23. 02. 95) & WO, 9302195, A1 & AU, 9223316, A & EP, 599868, A1 & NZ, 243594, A | 1-17 |
| X | ESAKA, M. et al., "Molecular cloning and nucleotide sequence of full-length cDNA for ascorbate oxidase from cultured pumpkin cells", Eur. J. Biochem. (1990) Vol. 191, No. 3 p.537-541 | 1-17 |
| X | SHAHAR, T. et al., "The tomato 66.3-kD polyphenoloxidase gene: molecular identification and developmental expression" The Plant Cell (1992) Vol. 4, No. 2 p.135-147 | 1-17 |
| X | JOY, R.W. et al., "Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of <i>Phytolacca americana</i> ", Plant Physiol. (1995) Vol. 107, No. 4 p.1083-1089 | 1-17 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
7 July, 1999 (07. 07. 99)Date of mailing of the international search report
21 July, 1999 (21. 07. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

CK

WO 99/54478
PCT/JP99/02045

PATENT COOPERATION TREATY

58

09/446089

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

ISHIDA, Takashi
A. Aoki, Ishida & Associates
Toranomon 37 Mori Building
5-1, Toranomon 3-chome
Minato-ku
Tokyo 105-8423
JAPON

| | | | |
|--|--|--|--|
| Date of mailing (day/month/year) 28 October 1999 (28.10.99) | | IMPORTANT NOTICE | |
| Applicant's or agent's file reference G837-PCT | | | |
| International application No. PCT/JP99/02045 | International filing date (day/month/year) 16 April 1999 (16.04.99) | Priority date (day/month/year) 17 April 1998 (17.04.98) | |
| Applicant SUNTORY LIMITED et al | | | |

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

AU,CN,EP,IL,JP,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

CA,NZ

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 28 October 1999 (28.10.99) under No. WO 99/54478

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

| | |
|---|------------------------------------|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer J. Zahra |
| Facsimile No. (41-22) 740.14.35 | Telephone No. (41-22) 338.83.38 |

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

| | | |
|---|--|--|
| (51) 国際特許分類 C12N 15/53, 15/29, 9/02, C12P 17/04, C07K 1/22, C12N 5/14, A01H 5/00 | A1 | (11) 国際公開番号 WO99/54478 (43) 国際公開日 1999年10月28日(28.10.99) |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP99/02045 (22) 国際出願日 1999年4月16日(16.04.99) (30) 優先権データ 特願平10/107296 1998年4月17日(17.04.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) サントリー株式会社(SUNTORY LIMITED)[JP/JP] 〒530-8203 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 榊原圭子(SAKAKIBARA, Keiko)[JP/JP] 〒617-0002 京都府向日市寺戸町西田中瀬3-1-327 Kyoto, (JP) 福井祐子(FUKUI, Yuuko)[JP/JP] 〒618-0014 大阪府三島郡島本町水無瀬2-8-2-907 Osaka, (JP) 田中良和(TANAKA, Yoshikazu)[JP/JP] 〒520-0246 滋賀県大津市仰木の里2-7-4 Shiga, (JP) 久住高章(KUSUMI, Takaaki)[JP/JP] 〒564-0073 大阪府吹田市山手町2-12-21-402 Osaka, (JP) 水谷正子(MIZUTANI, Masako)[JP/JP] 〒615-8086 京都府京都市西京区桂乾町53-60 Kyoto, (JP) | 中山 亨(NAKAYAMA, Toru)[JP/JP] 〒981-3202 宮城県仙台市泉区北高森2-1-305 Miyagi, (JP) (74) 代理人 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CA, CN, IL, JP, NZ, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書 | |
| (54)Title: GENE ENCODING PROTEIN HAVING AURONE SYNTHESIZING ACTIVITY (54)発明の名称 オーロン合成活性を有する蛋白質をコードする遺伝子 (57) Abstract A protein having an aurone synthase activity relating to the flower colors of <i>Antirrhinum majus</i> , etc., a gene, in particular, cDNA encoding the same and utilization thereof. By transferring this gene into a plant lacking chalcone isomerase, etc. and expressing it therein, the flower of the plant can be made yellow. | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02045

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/53, C12N15/29, C12N9/02, C12P17/04, C07K1/22, C12N5/14, A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/53, C12N15/29, C12N9/02, C12P17/04, C07K1/22, C12N5/14, A01H5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | JP, 7-501686, A (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization), 23 February, 1995 (23. 02. 95) & WO, 9302195, A1 & AU, 9223316, A & EP, 599868, A1 & NZ, 243594, A | 1-17 |
| X | ESAKA, M. et al., "Molecular cloning and nucleotide sequence of full-length cDNA for ascorbate oxidase from cultured pumpkin cells", Eur. J. Biochem. (1990) Vol. 191, No. 3 p.537-541 | 1-17 |
| X | SHAHAR, T. et al., "The tomato 66.3-kD polyphenoloxidase gene: molecular identification and developmental expression" The Plant Cell (1992) Vol. 4, No. 2 p.135-147 | 1-17 |
| X | JOY, R.W. et al., "Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of <i>Phytolacca americana</i> ", Plant Physiol. (1995) Vol. 107, No. 4 p.1083-1089 | 1-17 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
7 July, 1999 (07. 07. 99)Date of mailing of the international search report
21 July, 1999 (21. 07. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-501686

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)2月23日

(51) Int.Cl.⁸

C 1 2 N 15/09

A 0 1 H 1/00

C 1 2 N 9/02

識別記号

Z N A

Z N A A 8502-2B

9359-4B

9050-4B

庁内整理番号

F I

C 1 2 N 15/ 00

Z N A A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願平5-502480
 (86) (22) 出願日 平成4年(1992)7月16日
 (85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)1月17日
 (86) 国際出願番号 PCT/AU92/00356
 (87) 国際公開番号 WO93/02195
 (87) 国際公開日 平成5年(1993)2月4日
 (31) 優先権主張番号 PK7248
 (32) 優先日 1991年7月17日
 (33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), AU, CA, JP, US

(71) 出願人 コモンウェルス・サイエンティフィック・
 アンド・インダストリアル・リサーチ・オ
 ーガナイゼーション
 オーストラリア連邦オーストラリアン・キ
 ャピタル・テリトリー 2601, キャンベ
 ル, ライムストーン・アベニュー (番地な
 し)
 (72) 発明者 ロビンソン, シモン・ピアース
 オーストラリア連邦サウス・オーストラリ
 ア州5061, ハイド・パーク, オベイ・アベ
 ニュー 74
 (74) 代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外5名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリフェノールオキシダーゼ遺伝子

(57) 【要約】

ポリフェノールオキシダーゼ (PPO) 活性を有する
 ポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列また
 はそのフラグメント。

請求の範囲

1. ポリフェノールオキシダーゼ (PPO) 活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメント。
2. トランシットペプチドをコードするPPO遺伝子のプレ配列を含むDNA配列。
3. 正常なPPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードする配列またはそのフラグメントを含む請求項1に記載のDNA配列。
4. 触媒開裂部位を組み込んでいる請求項3に記載のDNA配列。
5. プレ配列が、PPOタンパク質を他の細胞区分に向けてるように他の標的配列によって置き換えられている請求項2に記載のDNA配列。
6. 図1に図示したような、推定上の葉緑体トランシットペプチド配列および成熟グレーブバインPPOポリペプチドをコードする配列を含む請求項2に記載のDNA配列。
7. 図2に図示したような、シラメの葉のPPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む請求項1に記載のDNA配列。
8. 図3に図示したような、リンゴ果実のPPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む請求項1に記載のDNA配列。
9. 図4に図示したような、ジャガイモ塊茎のPPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む請求項1に記載のDNA配列。
10. PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含む組換えDNAプラスミドを製造する方法であって、PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメント；およびプラスミド発現ベクターを提供し；そして該DNA配列および該プラスミド発現ベクターを反応させて、該DNA配列を該プラスミド発現ベクター中に配置することを含む上記方法。
11. DNA配列を、植物試料から単離されたポリアデニル化RNAから生成する請求項10に記載の方法。

18. ポリアデニル化RNAを処理する工程が、該ポリアデニル化RNAを逆転写酵素およびPPO特異的プライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し；
そのように生成されたcDNAをターミナルdトランスフェラーゼで処理して、ポリアデニル化RNAの3'末端に結合し；そして
そのように生成されたポリアデニル化cDNAを、PCRを用いて増幅させることを含む請求項13に記載の方法。

19. PPO特異的プライマーが、ブドウPPOに関して配列
5'-AATCTTGTGGTACTGGCG
を有するオリゴヌクレオチドプライマーでありまたは該PPO特異的プライマーが、ジャガイモ塊茎PPOに関して配列
5'-GACGGTACATTAGTCTTAAT
を有するオリゴヌクレオチドプライマーである請求項18に記載の方法。

20. cDNAを増幅させる工程が、配列
5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT
を有するオリゴヌクレオチドオリゴヌクレオチドアダプタープライマーおよびブドウPPOに関して配列
5'-ACCATCAGGCACGGTGGCGG
またはジャガイモ塊茎PPOに関して配列
5'-TGCTCATCAACTGGAGTTGAG
を有するPPO特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いる請求項19に記載の方法。

21. プラスミド発現ベクターがプラスミドベクタープラスクリプトSK⁺であり、DNA配列がcDNA配列であり、DNA配列をプラスミド発現ベクター中に配置する工程が、
該cDNAをクレンジングフラグメントでプラント末端付きにし；
そのように生成されたcDNAをアガロースゲル上で分別し；
予想の寸法のフラグメントをゲルから単離し；そして
該フラグメントをプラスクリプトSK⁺ベクターのHindIIIまたはE

12. 植物試料を、リンゴ、ジャガイモ、ブドウおよび豆から選択する請求項11に記載の方法。
13. PPOポリペプチド源を提供し；
PPOをコードするポリアデニル化RNAをそこから単離し；そして
コピーDNA (cDNA) を構築するように該ポリアデニル化RNAを処理する予備工程を含む請求項11に記載の方法。
14. ポリアデニル化RNAを処理する工程が、
該ポリアデニル化RNAを逆転写酵素およびアダプタープライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し；そして
そのように生成されたcDNAを、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて増幅させることを含む請求項13に記載の方法。
15. アダプタープライマーが、配列
5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT
を有するオリゴヌクレオチドアダプターである請求項14に記載の方法。
16. cDNAを増幅させる工程が、配列
5'-GACTCGAGTCGACATCG
を有するアダプタープライマーおよび5'末端プライマーを用いる請求項15に記載の方法。
17. 5'末端プライマーが、ブドウcDNAの増幅用に用いられる場合に配列
5'-CCATCAGGCACGATGATTTTCAAGTGGG；
豆cDNAの増幅用に用いられる場合に配列
5'-GCGGATCCTT[CT]TA[CT]GA[CT]GA[GA]AA[CT]AA；
リンゴcDNAの増幅用に用いられる場合に配列
(5'-GCGAATTCGA[AC]GA[TC]ATGGGAA[TC]TT[TC]TA)；
そしてジャガイモcDNAの増幅用に用いられる場合に配列
GEN3: (5'-GCGAATTCCTT[TC]TC]TTCCTTT[TC]CA[TC]AC]G)
GEN7: (5'-GCGAATTCAG[TC]GTGA[TC]AC]GATGTTGG)
を有する請求項16に記載の方法。

- c o R I 部位に連結することを請求項10に記載の方法。
22. PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含む組換えDNAプラスミドであって、単細胞生物において複製され、転写され、そして翻訳されることができるとする上記プラスミド。

23. DNA配列の上流の構成的プロモーター要素を含む請求項22に記載の組換えプラスミド。
24. DNA配列が、ブドウ、豆、リンゴまたはジャガイモ塊茎のPPO活性を有するポリペプチドをコードする請求項23に記載の組換えプラスミド。
25. 植物組織中のPPO活性の水準を低下させる方法であって、
修飾PPO遺伝子またはそのフラグメントを含むDNA構築物；および
植物試料を提供し；そして
該DNA構築物を該植物試料中に導入して形質転換した植物を製造することを
含む上記方法。

26. DNA構築物が、正常PPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードする配列またはそのフラグメントを含む請求項25に記載の方法。
27. DNA構築物が、PPO遺伝子またはそのフラグメントを含み、触媒開裂部位を組み込んでいる請求項26に記載の方法。

28. 植物試料を、グレーブバイン、ジャガイモ、リンゴおよび豆から選択された植物から得る請求項25に記載の方法。
29. DNA構築物が、
DNA配列を導入された二成分ベクター；および
果実または野菜の皮すなわち外皮に特異的であるプロモーターを含む請求項25に記載の方法。

30. 植物組織中のPPO活性の水準を増大させる方法であって、
PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子またはそのフラグメントを含むDNA構築物；および
植物試料を提供し；そして
該DNA構築物を該植物試料中に導入して形質転換した植物を製造することを
含む上記方法。

31. DNA構築物が、トランシットペプチドをコードするPPOプレ配列をコードしているDNA配列またはそのフラグメントを含む請求項30に記載の方法。

32. PPOプレ配列が、PPOタンパク質を他の細胞区分に向けてように他の標的配列と置き換えられている請求項31に記載の方法。

33. 植物試料を、タバコ、ソラマメ、トマト、茶、コーヒーおよびココアから選択された植物から得る請求項30に記載の方法。

34. DNA構築物が、DNA配列を導入された二成分ベクター；および果実または野菜の皮すなわち外皮に特異的であるプロモーターを含む請求項30に記載の方法。

35. PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを含むDNAプローブ。

36. PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

cDNAまたはゲノムライブラリー；およびPPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含むDNAプローブを提供し；そして該プローブを該ゲノムライブラリーとハイブリッド形成させて、該DNA配列を有するクローンを識別することを含む上記方法。

37. DNAプローブが、異種間に高度に保存されるリンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子のフラグメントを含むDNA配列を含む請求項36に記載の方法。

38. DNAプローブを、植物種からの全cDNA；およびPPO遺伝子と特異的にハイブリッド形成し且つ異種間に高度に保存されるリンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子の配列を含む2種類またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを提供し；そしてPCRを実施して、PPO遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを

増幅させることを含む方法によって製造する請求項37に記載の方法。

39. オリゴヌクレオチドプライマーが、PPOタンパク質上の銅結合性部位に対応するDNA配列を含む請求項38に記載の方法。

40. PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

植物から単離されたmRNA；
ポリ-dTアダプタープライマー；および2種類またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを提供し；
該mRNAを逆転写酵素およびアダプタープライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し；そして
そのように生成されたcDNAを、オリゴヌクレオチドプライマーおよびポリメラーゼ連鎖反応を用いて増幅させることを含む上記方法。

41. PPO遺伝子またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

発現ライブラリー；および精製PPOタンパク質に対して生じた多クローン性抗体を提供し；そして該多クローン性抗体と該発現ライブラリーとを反応させて、PPO遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを有するクローンを識別することを含む上記方法。

42. N末端アミノ酸配列
APIQAPDISKCGTATVPDGVTP
を有する、実質的に純粋な状態のPPOタンパク質。

明 細 書

ポリフェノールオキシダーゼ遺伝子

本発明は、果実および野菜のポリフェノールオキシダーゼ(PPO)活性を変更する方法並びにそこで使用するためのDNA配列に関する。

植物組織の褐変は、しばしば、引続きの損傷または損傷を引起し、概して、これは果実および野菜を腐敗させる結果となる。望ましくない褐変は、植物材料を加工して食品または他の製品を製造する際にも生じる。これらの褐変反応を防止する処置は輸送、貯蔵および加工中に講じられる。しばしば、これは二酸化硫黄などの化学物質の使用を必要とするが、これらの物質の使用は、それらの安全性および消費者の許容の懸念ゆえに将来において制限されると考えられる。例えば、米国食品医薬品局は、1986年に、大部分の生鮮果実および野菜に対する亜硫酸塩の使用を禁止した。褐変に対する感受性が本質的に低い果実および野菜変種の生産は、これらの化学物質処理の必要をなくするであろう。

したがって、本発明の目的は、先行技術に関連した1種類またはそれ以上の問題を克服するまたは少なくとも軽減することである。

植物の褐変が主として酵素PPOによって触媒されていることは理解される。PPOは植物細胞の色素体中に局在しているが、酵素のフェノール性基質は植物細胞液胞中に貯蔵されている。この分画は、植物細胞が損傷され、そして酵素およびその基質が混合されない限り、褐変反応を生じさせない。この酵素の量を減少させることができるならば、褐変に対する組織の感受性は減少するであろう。

PPO配列情報を用いて、正常なPPO遺伝子の発現を減少させるように植物を形質転換することができる合成遺伝子を構築し、それによって酵素の合成を減少させることができる。

更に、ある場合において、例えば、紅茶、ココア、コーヒー、黒胡椒、ブラックオリーブ等の生産においては、植物の褐変反応が望ましいことが理解される。これらの場合、PPOの量を増大させて、望ましい程度の褐変または風味成分の変化を生じさせることが望ましいことがある。

正常な植物の成長および発育におけるPPOの役割は、現在のところ理解されていない。この酵素の増大した濃度が植物病原体に対する増大した耐性と相関している場合が多数存在している。当然の結果として、PPO活性の水準を増大させる植物の遺伝子操作は、病原体および有害生物に対する有用な耐性を与えることができる。

グレーブバイン(grapevine)のPPO遺伝子は、成熟タンパク質のN末端の上流の追加の103アミノ酸をコードする。この領域は、葉緑体トランシットペプチドの性質を有し、しかもタンパク質が葉緑体中に引き入れられ且つ成熟PPOタンパク質を生産するように処理されるように目的をなすものであると考えられる。この遺伝子による植物の形質転換は、したがって、他種においてグレーブバインPPOの正しい標的および成熟を生じ且つこれらの組織の色素体中で活性グレーブバインPPO酵素の蓄積を引起すことができる。

本明細書中で用いられる「PPOをコードしている遺伝子」、「PPOをコードする遺伝子」または「PPO遺伝子」は、PPO遺伝子またはそれと実質的に相同の配列を意味すると理解されるべきである。

本発明の第一の態様において、ポリフェノールオキシダーゼ(PPO)活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを提供する。

DND配列は、トランシットペプチドをコードするPPO遺伝子のプレ配列を含んでいてよい。

DND配列は修飾されていてもよい。DNA配列は、正常なPPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードする配列またはそのフラグメントを含んでいてよい。

DNA配列は、触媒開裂部位を更に含んでいてよい。

或いは、プレ配列は、PPOタンパク質を他の細胞区分に向けてように他の標的配列によって置き換えることができる。

DNA配列は、図1に図示したような、推定上の葉緑体トランシット配列および成熟グレーブバインPPOタンパク質を含んでいてよい。

DNA配列は、図2に図示したような、ソラマメの葉のPPO活性を有するポ

リベチドをコードする遺伝子を含んでよい。

DNA配列は、図3に図示したような、リンゴ果実PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含んでよい。

DNA配列は、図4に図示したような、ジャガイモ塊茎PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含んでよい。

本発明のもう一つの態様において、PPOをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含む組換えDNAプラスミドを製造する方法であって、

PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメント；および

プラスミド発現ベクターを提供し；そして

該DNA配列および該プラスミド発現ベクターを反応させて、該DNA配列を該プラスミド発現ベクター中に配置することを含む上記方法を提供する。

PPOをコードするDNA配列は、例えば、植物試料から単離されたポリアデニル化RNAから生成することができる。植物は、リンゴ、ジャガイモ、ブドウおよび豆から選択することができる。好ましくは、植物試料は、スルタナブドウ果実、ソラマメの葉、リンゴの外皮若しくは皮層またはジャガイモ塊茎から単離される。

PPOをコードするDNA配列を提供するために、本発明の好ましい態様において、組換えDNAプラスミドの製造方法は、

PPOポリペプチド源を提供し；

PPOをコードするポリアデニル化RNAをそこから単離し；そして
コピーDNA (cDNA) を構築するように該ポリアデニル化RNAを処理する予備工程を含むことができる。

ポリアデニル化RNAの単離は、オリゴdTスパンカラムを用いて実施することができる。

本発明のこの態様にしたがってcDNAを構築するようにポリアデニル化RNAを処理する工程は、

該ポリアデニル化RNAを逆転写酵素およびアダプタープライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し；そして

ポリアデニル化RNAを逆転写酵素で処理する工程は、ブドウPPOに関して配列

5'-AATCTTTGTGGTGAAGTGGCG

を有するPPO特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いることができるしまたは該PPO特異的プライマーはジャガイモ塊茎PPOに関して配列

5' GACGGTACATTAGTCTTAAT

を有するオリゴヌクレオチドプライマーである。

cDNAを増幅させる工程は、配列

5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTITTTTTTTTTT

を有するオリゴヌクレオチドアダプタープライマーおよびブドウPPOに関して配列

5'-ACCATCAGGCACGGTGGCGG

またはジャガイモ塊茎PPOに関して配列

5'-TGCTCATCACTGGAAGTTGAG

を有するPPO特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いることができる。

二本鎖cDNAのクローニングのためのプラスミド発現ベクターは任意の適当な種類であってよい。プラスミドベクターブルスクリプト

(Bluescript) SK⁺は適当であることが分かっている。

クローニング工程は任意の適当な形式をとってよい。好ましい形式は

cDNAをクレンウフラグメントでプラント末端付きにし；

そのように生成されたcDNAをアガロースゲル上で分別し；

予想の寸法のフラグメントをゲルから単離し；そして

該フラグメントをブルスクリプトSK⁺ベクターのHindIIIまたはEcoRI部位に連結することを含むことができる。

このように生成されたクローンを試験するために、適当な微生物をプラスミド発現ベクターによって形質転換することができ、該微生物を培養し、そしてそこにおいてコードされたポリペプチドを発現させることができる。微生物大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5は適当であることが分かっている。

本発明のもう一つの態様において、PPO活性を有するポリペプチドをコード

そのように生成されたcDNAを、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて増幅させることを含むことができる。

ポリアデニル化RNAと逆転写酵素との反応工程は、配列

5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTITTTTTTTTTT

を有するオリゴヌクレオチドアダプタープライマーを用いることができる。

cDNAを増幅させる工程は、配列

5'-GACTCGAGTCGACATCG

を有するアダプタープライマーおよび5'末端プライマーを用いることができる。

5'末端プライマーは、ブドウcDNAの増幅用に用いられる場合、配列

5'-CCATCAGGCACATCGATTTTITTTTTTTTTT

を有することができる。

5'末端プライマーは、豆cDNAの増幅用に用いられる場合、配列

5'-GCGGATCCTT[CT]TA[CT]GA[CT]GA[GA]AA[CT]AA

を有することができる。

5'末端プライマーは、リンゴcDNAの増幅用に用いられる場合、配列

(5'-GCGAATTCGA[AG]GA[TC]ATGGGIAA[TC]TT[TC]TA)

を有することができる。

5'末端プライマーは、ジャガイモcDNAの増幅用に用いられる場合、配列

GEN3: (5'-GCGAATTCCTT[TC][TC]TTCCTT[TC]CA[TC][AC]G)

GEN7: (5'-GCGAATTCAT[TC]GTGA[TC][AC]GATGTTG)

を有することができる。

或いは、本発明のこの態様にしたがってcDNAを構築するようにポリアデニル化RNAを処理する工程は、

該ポリアデニル化RNAを逆転写酵素およびPPO特異的プライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し；

そのように生成されたcDNAをターミナルdトランスフェラーゼで処理して、ポリアデノシン尾部配列を該cDNAの3'末端に結合し；そして

そのように生成されたポリアデニル化cDNAをPCRによって増幅させることを含むことができる。

するDNA配列またはそのフラグメントを含む組換えDNAプラスミドであって、単細胞生物において複製され、転写され、そして翻訳されることができる上記プラスミドを提供する。

プラスミド発現ベクターは任意の適当な種類であってよい。組換えプラスミドは、PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列の上流の構成的プロモーター要素を含むことができる。

本発明のもう一つの態様において、植物組織中のPPO活性の水準を低下させる方法であって、

修飾PPO遺伝子またはそのフラグメントを含むDNA構築物；および

植物試料を提供し；そして

該DNA構築物を該植物試料中に導入して形質転換した植物を製造することを含む上記方法を提供する。

DNA構築物は、正常PPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードしている配列またはそのフラグメントを含むことができる。DNA構築物は、PPO遺伝子またはそのフラグメントを含み、触媒開裂部位を組込んでいることができる。

植物は任意の適当な種類であってよい。好ましい態様において、植物は、グレープバイン、ジャガイモ、リンゴおよび豆を含む群より選択することができる。

本発明のもう一つの態様において、植物組織中のPPO活性の水準を増大させる方法であって、

PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子またはそのフラグメントを含むDNA構築物；および

植物試料を提供し；そして

該DNA構築物を該植物試料中に導入して形質転換した植物を製造することを含む上記方法を提供する。

DNA構築物は、PPOブレ配列をコードしているDNA配列またはそのフラグメントを含むことができる。

植物は任意の適当な種類であってよい。好ましい態様において、植物は、タバコ、ソラマメ、トマト、茶、コーヒーおよびココアから成る群より選択すること

ができる。

トランシットペプチドをコードする配列は、PPOタンパク質を他の細胞区分に向けて、他の標的配列と置き換えることができる。異種遺伝子を植物細胞の液胞、ミトコンドリアまたは細胞内空間に向けての配列は既に知られている。更に、グレープバインPPOに関するトランシット配列を用いて他のタンパク質を色素体に集中させることができた。

DNA構築物は、導入された遺伝子を植物中の至る所で発現させると考えられる構成的プロモーターを含むことができる。

多数の植物組織中において、PPOがある組織種中で高度に発現されることは理解される。例えば、PPO活性はブドウ果実の皮において果肉の場合よりもはるかに高く、そしてジャガイモ塊茎の外皮は皮層よりも高い活性を有する。

PPO活性の水準を植物のある組織中においてのみまたは植物のある发育段階でのみ変更することは望ましいことがあるが、これは特異的プロモーター要素を用いることによって達成することができる。例えば、バクティン

(patatin) プロモーターの使用は、ジャガイモ植物の塊茎組織中においてのみPPO濃度を変更する。これは塊茎におけるPPO活性を低下させ且つ褐変を減少させるが、ジャガイモ植物の他の部分におけるPPO活性は変化しない。

したがって、DNA構築物は、果実および野菜の外皮すなわち皮に対して特異的であるプロモーターを含んで、異種タンパク質を外部組織層に特異的に集中させることができる。

これは、外皮すなわち皮の性質、例えば、色、風味、病原体に対する耐性等を、消費される果実または野菜の内部とは無関係に操作することを可能にする。

好ましい態様において、DNA構築物は、PPOをコードしているDNA配列またはそのフラグメントを導入された二成分ベクターを含むことができる。

もう一つの好ましい態様において、DNA構築物の植物中への導入は、DNA構築物を有するアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) による植物の感染によることができる。

本発明のもう一つの態様において、形質転換した植物であって、正常なPPO遺伝子の発現を変更しうる合成遺伝子を含む上記植物を提供する。

PPO遺伝子と特異的にハイブリッド形成し且つ異種間に高度に保存されるリンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子の配列を含む2種類またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを提供し；そして

PCRを行なって、PPO遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを増幅させることを含む方法によって製造することができる。

オリゴヌクレオチドプライマーは、PPOタンパク質上の銅結合性部位に対応するDNA配列を含むことができる。

本発明のもう一つの態様において、PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

植物種から単離されたmRNA；

ポリ-dTアダプタープライマー；および

2種類またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを提供し；

mRNAを逆転写酵素およびアダプタープライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し；そして

そのように生成されたcDNAを、オリゴヌクレオチドプライマーおよびポリメラーゼ連鎖反応を用いて増幅させることを含む上記方法を提供する。

好ましい態様において、オリゴヌクレオチドプライマーは、リンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子配列に基づくことができる。

本発明のもう一つの態様において、PPOタンパク質の精製法であって、

植物試料；

デタージェント；および

1種類またはそれ以上のクロマトグラフィーカラムを提供し；

該植物試料を該デタージェントで抽出し；

そのように生成された抽出物を硫酸アンモニウムで処理し；そして

そのように生成された抽出物を、それをクロマトグラフィーカラムに通すことによって分別することを含む上記方法を提供する。

植物試料は任意の適当な種類であってよい。植物試料はグレープバイン果実であってよい。この組織は高濃度のPPOを含み、成熟ブドウ果実の果汁中の大部

植物は任意の適当な種類であってよい。好ましい態様において、植物は、グレープバイン、ジャガイモ、リンゴ、タバコ、豆、モモ、ナシおよびアズキから成る群より選択することができる。

本発明のもう一つの態様において、PPOをコードしている配列またはそのフラグメントを含む植物用ワクチンを提供する。

本発明のもう一つの態様において、PPOをコードしているDNA配列またはそのフラグメントを含むDNAプローブを提供する。

プローブは、任意の適当な方式で標識することができる。放射性標識または非放射性標識を用いることができる。便宜上、プローブは、適当なプラスミドベクター中のクローン化されたインサートの形で提供することができる。

グレープバインPPO配列を用いて、この遺伝子を他の種から得るようにPCRで用いるための一般的な目的オリゴヌクレオチドプライマーを設計することができる。植物PPOタンパク質は補欠分子族として銅を含むことが知られており、そしてヘモシアニンおよびチロシナーゼタンパク質からの配列に対して相同を示し、これらのタンパク質上の銅結合性部位に対応するブドウタンパク質配列の二つの領域が識別された。これらの領域は種々の生物間で明らかに保存されるので、それらは、他の植物PPO遺伝子を得るようにプローブおよびプライマーを設計するのに適している。

したがって、本発明の更にもう一つの態様において、PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

cDNAまたはゲノムライブラリー；および

ポリフェノールオキシダーゼ (PPO) 活性を有するポリペプチドの遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを含むDNAプローブを提供し；そして該プローブをゲノムライブラリーとハイブリッド形成させて、該DNA配列を有するクローンを識別することを含む上記方法を提供する。

DNAプローブは、異種間に高度に保存されるリンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子のフラグメントを含むDNA配列を含むことができる。

DNAプローブは、植物種からの全cDNA；および

分のPPO活性は固形物によるものであり、遠心分離によって果汁から分離した後にデタージェントによって可溶化することができる。植物試料は豆の葉であってよい。

デタージェントは陽イオン性であってよい。臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (CTAB) デタージェントは適当であることが分かっている。

クロマトグラフィーカラムはセファロース基材であってよい。3種類のクロマトグラフィーカラムを用いることができる。Qセファロースに続いてフェニルセファロース、次にヒドロキシルアパタイトが適当であることが分かっている。

本発明のもう一つの態様において、N末端アミノ酸配列

APIQAPDISKCGTATVPDGVTP

を有する実質的に純粋な状態のPPOタンパク質を提供する。

ここで、本発明を実施例および図面に関して更に充分に記載する。しかしながら、以下の説明が単に例示するためのものであることは理解されるべきであり、いかなる場合にも上記の本発明の一般性を制限するものとしてとるべきではない。

図面において、

図1：

推定上の葉緑体トランシット配列および成熟グレープバインPPOタンパク質双方をコードする複合完全長GPO1 cDNAヌクレオチド配列および誘導タンパク質配列。

翻訳開始部位をボールド体で示し、成熟タンパク質のN末端に星印を付ける。破線はN末端プライマーの位置を示し、そして2本の実線は、トランシットペプチド配列をクローニングするための2種類のアンチセンスプライマーを構築するのに用いられた領域を示す。

図2：

ソラマメの葉のポリフェノールオキシダーゼのBPO1クローンの核酸および誘導タンパク質配列。実線は、ポリメラーゼ連鎖反応によってcDNAを増幅させるのに用いたB15プライマーの領域を示す。

図3：

リンゴ果実PPOをコードするクローンpSR7およびpSR8の核酸および

誘導タンパク質配列。実際は、ポリメラーゼ連鎖反応によってcDNAを増幅させるのに用いたGEN4プライマーの領域を示す。

図4:

ジャガイモ塊茎PPOをコードするクローンの核酸および誘導タンパク質配列。実際は、ポリメラーゼ連鎖反応によってcDNAを増幅させるのに用いたGEN3プライマーの領域を示す。

実施例1

PPOタンパク質の精製

PPOをグレープバイン果実から精製した。最初の実験により、この組織が高濃度の酵素を含んでいることおよびドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド(SDS-PAGE)ゲルでの電気泳動によって確認されたように酵素が1種類だけの状態で存在しているらしいことが分かった。成熟ブドウ果実の果汁中に、大部分のPPO活性は固形物によるものであって、遠心分離によって果汁から分離した後にデタージェントで可溶化することができた。精製中の酵素活性は、基質である4-メチルアルコールの存在下で消費された酸素として測定された。精製中の全工程を4℃で実施した。

スルタナブドウ30キログラムを小規模のワインプレスで圧搾し、そして100mMアスコルビン酸塩に10mMジチオトレイトールを加えた溶液100mlを、ブドウ果汁各900mlに加えた。果汁を10,000xgで10分間遠心分離し、そして上澄みを捨てた。ペレット部分を、10mMアスコルビン酸塩および1mMジチオトレイトールを加えた25mMリン酸ナトリウム、pH7.2中に最終容量1.75リットルまで再懸濁させた後、陽イオンデタージェントである臭化ドデシルトリメチルアンモニウム(CTAB)の4%(w/v)溶液250mlを加えた。20分間インキュベートした後、抽出物を15,000xgで15分間遠心分離した。上澄みを固体硫酸アンモニウムで45%まで飽和させ、pHを7.0に調整した後、それを15,000xgで15分間遠心分離した。この上澄みを固体硫酸アンモニウムで95%まで飽和させ、pHを7.0に調整した後、それを15,000xgで30分間遠心分離した。ペレットを、10mMアスコルビン酸塩および2mMジチオトレイトールを加えた20mMビースト

ブドウ果実PPOの精製

| 工程 | タンパク質 (mg) | 活性 (U) | 比活性 (U/mg) | 回収率 (%) | 精製 (一倍) |
|-------------|---------------|-----------|---------------|------------|------------|
| 果汁* | 19,360 | 7,040 | 0.4 | 100 | 1 |
| CTAB抽出物 | 960 | 2,070 | 2.2 | 29 | 6 |
| 硫酸アンモニウム | 600 | 1,760 | 2.9 | 25 | 8 |
| Q-セファロース | 130 | 1,520 | 11.8 | 22 | 33 |
| フェニルセファロース | 10.8 | 400 | 37 | 6 | 103 |
| ヒドロキシルアパタイト | 3.5 | 230 | 65 | 3 | 180 |

*ブドウ30kgから

精製純度は、SDS-PAGEを変性することによって検査した。見掛けの分子量が40kDaのタンパク質の単純なバンドは最終製品中において示された。

実施例2

アミノ酸配列決定

精製PPOタンパク質約1mgを、20mM塩酸アンモニウム、pH7.6で平衡させたセファデックスG25の2.5x20cmカラムにおいて流速5ml/分で脱塩した。タンパク質ピークを集め且つ窒素下で乾燥させた。乾燥タンパク質をカルボキシメチル化し、そしてN末端アミノ酸配列を、自動アミノ酸シーケンセーターを用いてエドマン分解によって決定した。下記の配列

APIQAPDISKCGTATVPDGVTP

を得た。

実施例3

ブドウPPO遺伝子のクローニング

リザイアン(Rezaian)およびクラーク(Krake)(1)の方法にしたがって、全RNAをスルタナブドウ果実から単離した。全RNAを1種類のオリゴdTスパンカラム(ファーマシア・エルケイビー・バイオテクノロジー(Pharmacia LKB Biotechnology))に通すことによってポリ(A)⁺に富むRNA画分を得た。

リズープロバン、pH7.5(バッファーA)中に最終容量100mlで再懸濁させた。抽出物を、バッファーAで平衡させたセファデックスG25の4x40cmカラムにおいて流速10ml/分で脱塩し、そして活性画分を集めた。

抽出物を、バッファーAで平衡させたQ-セファロース・ファスト・フローの2.5x10cmカラムに流速6ml/分で入れた後、カラムをバッファーA400mlで洗浄した。PPOをバッファーA中の0~500mM NaClの勾配で溶離し、そして活性画分を集めた。硫酸アンモニウムを最終濃度1Mまで加え、pHを7.0に調整した。この画分を、1M硫酸アンモニウム、1M KClおよび1mMジチオトレイトールを加えた50mMリン酸ナトリウム、pH7.0(バッファーB)で平衡させたフェニルセファロース・ファスト・フローの1x35cmカラムに流速1.5ml/分で充填した。カラムをバッファーB120mlで洗浄した後、PPOを100~0%バッファーBの勾配で溶離した。活性画分を集め且つアミコン(Amicon)PM10限外濾過膜上で濃縮した後、1mMジチオトレイトールを加えた20mMリン酸カリウム、pH7.0(バッファーC)を3回取り換えるのに対して同一膜でダイアフィルトレーションを行った。この画分を、バッファーCで平衡させたヒドロキシルアパタイトの1x30cmカラムに流速1ml/分で入れた。カラムをバッファーC50mlで洗浄した後、PPOをバッファーC中0~500mMリン酸カリウムの勾配で溶離した。集めた活性画分をグリセロール中で20%(v/v)にし且つ-80℃で冷凍した。

この操作の結果、180倍に精製したPPOが得られ且つ精製PPOタンパク質3.5mgを生成した。精製を以下に要約する。

第一鎖cDNAを、50mMトリス-HCl pH8.3、25mM KCl、10mM MgCl₂、4mM DTT、1mM NaPPi、1mM dNTPs、リボヌクレアーゼ阻害剤1U、ブドウ果実のポリ(A)⁺に富むRNA1.4μg、AMV逆転写酵素(プロメガ・コープ(Promega Corp))21UおよびハイブリッドdT17-アダプタープライマー

(5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTT)

0.5μgを含む反応混合物中において42℃で1時間合成した。次に、反応混合物をTE(10mMトリス-HCl pH8.0、1mM EDTA)で80μlまで希釈し且つ-20℃で貯蔵した。

32マーオリゴヌクレオチドプライマー

(5'-CCATATCAGGCCICGATATATTCIAAGTCGG)

を、精製ブドウPPOのN末端タンパク質配列(アミノ酸2~12)に対して設計した。コドン使用表に基づいて3個以上の塩基を選択することができる位置でイノシンを用いた。これおよび他の記載したオリゴヌクレオチドプライマー全部をアプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)DNA合成機で合成した。

cDNAを、フロマン(Frohman)(2)の方法に本質的にしたがって、10mMトリス-HCl(25℃でpH9.0)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTPs、0.01%ゼラチン(w/v)、0.1%トリトンX-100、希釈した第一鎖cDNA反応混合物5μl、Taq DNAポリメラーゼ(プロメガ・コープ)1.25U、100nMアダプタープライマー

(5'-GACTCGAGTCGACATCG)

および1μM N末端プライマー(上記に記載の)を含む反応混合物50μl中においてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅させた。増幅は、94℃で1分間の変性、55℃で1分間のアニーリング、72℃まで2分間にわたるスローランプおよび72℃で3分間の伸長を5サイクルの初期プログラムに続いて、94℃1分間、55℃1分間および72℃3分間を25サイクル実施した。増幅されたDNAをフェノール/クロロホルムで抽出し、エタノールで沈殿させ、そ

してTE中に再懸濁させた。DNAをクレノウフラグメントでプラント末端付にし、そして2%ヌシブ(Nusieve) GTGアガロース(FMCバイオロダクツ(Bioproductions))ゲル上で分別した。1700bpフラグメントをゲルから単離し且つブルースクリプトSK⁺ベクター(ストラタジーン・クローニング・システムズ(Stratagene Cloning Systems))のHincII部位に連結させた。連結したDNAを大腸菌DH5中に導入した。陽性クローン(GPOと称する)を単離し且つジデオキシ配列決定法(3)によって配列決定した。

これは、N末端プライマーの存在を確認し、そして該プライマーの下流の誘導タンパク質配列と、上記の精製ブドウPPO酵素に関して得られたN末端タンパク質配列との比較により、このクローンがブドウPPOをコードすることが確認された。

実施例4

トランシットペプチド配列のクローニング

上記の1700bpクローンでプローブされたブドウmRNAのノーザンブロットにより、該クローンとハイブリッド形成した2200bpの転写物が識別された。これは、そのクローンが成熟PPO配列のN末端をコードしていたとしても、クローンの5'プライム末端の上流に更に別の配列が存在したことを示唆した。GPO1 mRNAの5'末端を有するcDNAクローン(推定上のトランシットペプチドをコードする)を、本質的には(2)に記載の通りであるが改め込まれたアンチセンスプライマーを用いてブドウ果実RNAから増幅させた。第一鎖cDNAを、上記に記載の通りであるがハイブリッドdT17-アダプタープライマーの代わりに、N末端プライマー領域の下流の44塩基領域(すなわち、416~435nt;図1)に相補的なGPO1特異的プライマー1

(5'-AATCTTTGTGGTGACTGGCG)

を置き換えて、ブドウ果実のポリ(A)⁺に富むRNAから合成した。反応混合物を0.1xTEで2mlまで希釈し且つセントリコン(Centricon)30スピンフィルター(アミコン・コープ)によって4000gで20分間遠心分離して過剰のプライマーを除去した。この工程を繰返し、そして残留する液体

17-アダプタープライマー

(5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT)

0.81μgを含む反応混合物中において42℃で1時間合成した。次に、反応混合物をTE(10mMトリス-HCl pH8.0, 1mM EDTA)で840μlまで希釈し且つ-20℃で貯蔵した。

25マーオリゴヌクレオチドプライマー(B15)

(5'-GCGGATCCTT[CT]TA[CT]GA[CT]GA[GA]AA[CT]AA)

を、ブドウPPOの配列に基づいて設計した。

cDNAを、本質的にはフローマン(2)の方法にしたがって、10mMトリス-HCl(25℃でpH9.0)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTPs、0.01%ゼラチン(w/v)、0.1%トリトンX-100、希釈した第一鎖cDNA反応混合物20μl、Taq DNAポリメラーゼ(プロメガ・コープ)2.5U、100nMアダプタープライマー

(5'-GACTCGAGTCGACATCG)

および1μM B15プライマー(上記に記載の)を含む反応混合物100μl中においてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅させた。

増幅は、94℃で1分間の変性、37℃で2分間のアニーリング、72℃まで2分間におたるスローランプおよび72℃で3分間の伸長を3サイクルの初期プログラムに続いて、94℃1分間、55℃1分間および72℃3分間を25サイクル実施した。増幅されたDNAをフェノール/クロロホルムで抽出し、エタノールで沈殿させ、そしてTE中に再懸濁させた。DNAをクレノウフラグメントでプラント末端付にし、そして2%ヌシブGTGアガロース(FMCバイオロダクツ)ゲル上で分別した。700bpフラグメントをゲルから単離し且つブルースクリプトSK⁺ベクター(ストラタジーン・クローニング・システムズ)のEcoRV部位に連結させた。連結したDNAを大腸菌DH5中に導入した。組換え体クローンを、ブドウPPOクローン(GPO1)の放射性標識フラグメントを用いてスクリーンし、そして陽性クローン(BPO1と称する)を単離し且つジデオキシ配列決定法(3)によって配列決定した。

を、スピードVac遠心分離を用いて20μlまで濃縮した。ポリ(dA)尾部配列は、37℃で5分間に続いて65℃で5分間インキュベートした後にTEで500μlまで希釈されたcDNA11.5μl、5xテリングバッファー(プロメガ・コープ)4μl、ATP(1mM)4μlおよびターミナルdトランスフェラーゼ(プロメガ・コープ)10Uを含む反応混合物20μl中のターミナルdトランスフェラーゼによってcDNA鎖の3'末端に結合された。ポリ(dA)末端付きcDNAのPCR増幅は、10mMトリス-HCl(25℃でpH9.0)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTPs、0.01%ゼラチン(w/v)、0.1%トリトンX-100、希釈した第一鎖cDNA反応混合物5μl、Taq DNAポリメラーゼ(プロメガ・コープ)1.25U、200nMハイブリッドdT17-アダプタープライマーおよび、N末端プライマー結合性領域のすぐ下流の領域(374~393nt;図1)に相補的な900nM GPO1特異的プライマー2

(5'-ACCATCAGGCACGGTGGCGG)

を含む反応混合物中において実施した。増幅は、94℃1分間、55℃1分間および72℃3分間を25サイクル実施した。得られた430bpフラグメントをブルースクリプトSK⁺ベクターでクローン化し、前記のように配列決定し、そしてGPO1クローンと重複する配列の予想領域を含むことが分り、このcDNAクローンがGPO1mRNAの5'末端を含むことが確認された。

実施例5

豆の葉のPPO遺伝子のクローニング

リザイアンおよびクラーク(1)の方法にしたがって、全RNAをソラマメの葉から単離した。全RNAを1種類のオリゴdTスパンカラム(ファーマシア・LKB・バイオテクノロジー)に通すことによってポリ(A)⁺に富むRNA画分を得た。

第一鎖cDNAを、50mMトリス-HCl pH8.3、25mM KCl、10mM MgCl₂、4mM DTT、1mM NaPPi、1mM dNTPs、リボヌクレアーゼ阻害剤1U、ソラマメのポリ(A)⁺に富むRNA3.1μg、AMV逆転写酵素(プロメガ・コープ)21UおよびハイブリッドdT

実施例6

リンゴPPO遺伝子のクローニング

リザイアンおよびクラーク(1)の方法にしたがって、全RNAを成熟リンゴ果実から単離した。ポリ(A)⁺に富むRNA画分は、ポリATトラクトmRNAキット(プロメガ・コーポレーション)を用いて得られた。

第一鎖cDNAを、50mMトリス-HCl pH8.3、25mM KCl、10mM MgCl₂、4mM DTT、1mM NaPPi、1mM dNTPs、リボヌクレアーゼ阻害剤40U、リンゴのポリ(A)⁺に富むRNA1μg、AMV逆転写酵素(プロメガ・コープ)24UおよびハイブリッドdT17-アダプタープライマー

(5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT)

0.54μgを含む反応混合物25μl中において42℃で1時間合成した。次に、反応混合物をTE(10mMトリス-HCl pH8.0, 1mM EDTA)で525μlまで希釈し且つ-20℃で貯蔵した。

28マーオリゴヌクレオチドプライマー(GEN4)

(5'-GCGAATCGA[AG]GA[TC]ATGGGIAA[TC]TT[TC]TA)

を、ブドウPPOの配列に基づいて設計した。

cDNAを、本質的にはフローマン(2)の方法にしたがって、10mMトリス-HCl(25℃でpH9.0)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTPs、0.01%ゼラチン(w/v)、0.1%トリトンX-100、希釈した第一鎖cDNA反応混合物20μl、Taq DNAポリメラーゼ(プロメガ・コープ)2.5U、100nMアダプタープライマー

(5'-GACTCGAGTCGACATCG)

および1μM GEN4プライマー(上記に記載の)を含む反応混合物100μl中においてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅させた。

増幅は、94℃で1分間の変性、37℃で2分間のアニーリング、72℃まで2分間におたるスローランプおよび72℃で3分間の伸長を3サイクルの初期プログラムに続いて、94℃1分間、55℃1分間および72℃3分間を25サイ

クル実施した。増幅されたDNAをフェノール/クロロホルムで抽出し、エタノールで沈殿させ、そしてTE中に再懸濁させた。DNAをクレノウフラグメントでプラント末端付きにし、そして2%メシーブGTGアガロース (FMCバイオロダクツ) ゲル上で分別した。1050bpのフラグメントをゲルから単離し且つブルースクリプトSK⁺ベクター (ストラタジーン・クローニング・システムズ) のEcoRV部位に連結させた。連結したDNAを大腸菌DH5中に導入した。組換え体クローンを、ブドウPPOクローン (GPO1) の放射性標識フラグメントを用いてスクリーンし、そして2種類の陽性クローン (pSR7およびpSR8と称する) を単離し且つジデオキシ配列決定法 (3) によって配列決定した。

実施例7

ジャガイモPPO遺伝子のクローニング

ロージマン (Logemann) ら (4) の方法にしたがって、全RNAを未熟ジャガイモ塊茎から単離した。ポリ (A)⁺に富むRNA画分は、ポリATラクトmRNAキット (プロメガ・コーポレーション) を用いて得られた。

第一鎖cDNAを、50mMトリス-HCl pH8.3、25mM KCl、10mM MgCl₂、4mM DTT、1mM NaPPi、1mM dNTPs、リボヌクレアーゼ阻害剤40U、ジャガイモのポリ (A)⁺に富むRNA 1.8μg、AMV逆転写酵素 (プロメガ・コープ) 24UおよびハイブリッドdT17-アダプタープライマー

(5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTT)

0.54μgを含む反応混合物25μl中において42℃で1時間合成した。次に、反応混合物をTE (10mMトリス-HCl pH8.0、1mM EDTA) で525μlまで希釈し且つ-20℃で貯蔵した。

2種類のオリゴヌクレオチドプライマーを、ブドウおよびリンゴのPPOの配列中の領域から設計した。

GEN3: (5'-GCCGAATTCCTTTC)[TC]TCCCTTTC[TC]CA[TC][AC]G)

GEN7: (5'-GCCGAATTC[TC]GTGTA[TC][AC]GATGTCG)

cDNAを、本質的にはフローマン (2) の方法にしたがって、10mMトリス

イマーを除去した。この工程を繰返し、そして残留する液体を、スピードVac遠心分離を用いて12μlまで濃縮した。ポリ (dA) 尾部配列は、37℃で5分間に続いて65℃で5分間インキュベートした後にTEで500μlまで希釈されたcDNA 11.5μl、5xテリングバッファー (プロメガ・コープ) 4μl、ATP (1mM) 4μlおよびターミナルdトランスフェラーゼ (プロメガ・コープ) 10Uを含む反応混合物20μl中においてターミナルdトランスフェラーゼによってcDNA鎖の3'末端に結合された。ポリ (dA) 末端付きcDNAのPCR増幅は、10mMトリス-HCl (25℃でpH9.0)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTPs、0.01%ゼラチン (w/v)、0.1%トリトンX-100、希釈した第一鎖cDNA反応混合物5μl、Taq DNAポリメラーゼ (プロメガ・コープ) 1.25U、200nMハイブリッドdT17-アダプタープライマーおよびpSRP32およびpSRP33の5'末端の下流の233~254塩基領域に相補的な900nM ジャガイモ塊茎PPO特異的プライマー2

(5'-TGCTCATCACTGGAGTTGAC)

を含む反応混合物中において実施した。増幅は、94℃1分間、55℃1分間および72℃3分間を25サイクル実施した。得られたフラグメントをブルースクリプトSK⁺ベクターでクローン化し、前記のように配列決定し、そしてpSRP32クローンと重複する配列の予想領域を含むことが分かり、このcDNAクローンはジャガイモ塊茎mRNAの5'末端を含むことが確認された。

参考文献

1. リザイアン (Rezaian), M. A. およびクラーク (Krake), L. R. (1987). グレープバインの核酸抽出およびその検出 (Nucleic acid extraction and vine detection in grapevine). *J. Vir. Methods* 17: 277~285.
2. フローマン (Frohmann), M. A. (1990). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (M. A. Innis), ゲルフアンド

-HCl (25℃でpH9.0)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTPs、0.01%ゼラチン (w/v)、0.1%トリトンX-100、希釈した第一鎖cDNA反応混合物20μl、Taq DNAポリメラーゼ (プロメガ・コープ) 2.5U、100nMアダプタープライマー

(5'-GACTCGAGTCGACATCG)

および1μM GENプライマー (上記に記載の) を含む反応混合物100μl中においてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって増幅させた。

増幅は、94℃で1分間の変性、37℃で2分間のアニーリング、72℃まで2分間にわたるスローランプおよび72℃で3分間の伸長を3サイクルの初期プログラムに続いて、94℃1分間、55℃1分間および72℃3分間を25サイクル実施した。増幅されたDNAをフェノール/クロロホルムで抽出し、エタノールで沈殿させ、そしてTE中に再懸濁させた。DNAをクレノウフラグメントでプラント末端付きにし、そして2%メシーブGTGアガロース (FMCバイオロダクツ) ゲル上で分別した。1500bpおよび1000bpのフラグメントをゲルから単離し且つブルースクリプトSK⁺ベクター (ストラタジーン・クローニング・システムズ) のEcoRV部位に連結させた。連結したDNAを大腸菌DH5中に導入した。組換え体クローンを選択し、そして3種類のクローン (pSRP32、pSRP33およびpSRP72と称する) を単離し且つジデオキシ配列決定法 (3) によって配列決定した。

ジャガイモ塊茎PPO mRNAの5'末端を有するcDNAクローンを、本質的には (2) に記載の通りであるが嵌め込まれたアンチセンスプライマーを用いてジャガイモ塊茎RNAから増幅させた。第一鎖cDNAを、上記に記載の通りであるがハイブリッドdT17-アダプタープライマーの代わりに、pSRP32およびpSRP33の5'末端の下流の257~278塩基領域に相補的なジャガイモ塊茎PPO特異的プライマー1

(5'-GACGGTACATTAGTGTAAAT)

を置き換えて、ジャガイモ塊茎のポリ (A)⁺に富むRNAから合成した。反応混合物を0.1xTEで2mlまで希釈し且つセントリコン30スピニングフィルター (アミコン・コープ) によって4000gで20分間遠心分離して過剰のプラ

(Gelfand), D. H.、スニンスキー (Sninsky), J. J.、ホワイト (White), T. J. 監修、アカデミック・プレス (Academic Press)、ニューヨーク、28~38頁。

3. サンガー (Sanger), F.、ニックレン (Nicklen), S. およびクルソン (Coulson), A. R. (1977). 鎖終結阻害剤によるDNA配列決定 (DNA sequencing with chain-terminating inhibitors). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463~5467.

4. ロージマン (Logemann), J.、シェール (Schell), J. およびウィルミッツァー (Willmitzer), L. (1987). 植物組織からRNAを単離する改良法 (Improved method for the isolation of RNA from plant tissues). *Analytical Biochemistry* 163: 16~20.

最後に、本明細書中に概説した本発明の精神から逸脱することなく様々な他の修正および/または変更を行なうことができることは理解されるべきである。

FIGURE 1

10 20 30 40 50 60
ATCACTCATCACTCCTCCTCTAAAGCTATGGCTTCTTTGCTTGGTCGCTCACAACCTCC
M A S L P W S L T T S

70 80 90 100 110 120
ACCGCATCGCCAAACACCAACATTTCAGCCTTCCCACTTCTCCCTTGTTCAAAGG
T A I A N T T N I S A F P P S P L F Q R

130 140 150 160 170 180
GCTTCTCATGTCCCGTAGCCAGAAACCGAAGCCGAGATTGCTCCTAGTAAGGTGTCG
A S H V P V A R N R S R R F A P S K V S

190 200 210 220 230 240
TGCAATTCTGCGAATGGTGATCCCACTCGGATTCTACTCTCCGACGTTCCGAGAACTCC
C N S A N G D P N S D S T S D V R E T S

250 260 270 280 290 300
TCAGGGAAGTAGATAGGAGGAATGTGCTTCTGGCATAGGAGGGCTGTATGGTGTGCT
S G K L D R R N V L L G I G G L Y G A A

310 320 330 340 350 360
GGCGGTCTCGGCCCACTAAGCCATTAGCCTTGGGGCTCCCATCCAGGCACCGGATATA
G G L G A T K P L A F G A P I Q A P D I

370 380 390 400 410 420
TCCAAGTGTGGTACCGCCACCTGCTGATGGTGTAAAGCCCAAAATTGCTCGCGGCA
S K C G T A T V P D G V T P T N C C P P

430 440 450 460 470 480
GTACCCACAAAGATTATAGATTTCAGCTACCTTCTCAGGTTCCGCCATGGGTACCAGG
V T T K I I D F Q L P S S G S P M R T R

1030 1040 1050 1060 1070 1080
CCTGGAGCGGGTACCCTTGAGCAGCCGCCACATAATATAGTCCACAAATGGACTGCTCTT
P G A G T L E H A P H N I V H K W T G L

1090 1100 1110 1120 1130 1140
GCTGATAAGCCTAGTGAGGACATGGGAACTTCTATCTGCCGCGAGAGACCCCATATTC
A D K P S E D M G N F Y T A G R D P I F

1150 1160 1170 1180 1190 1200
TTCGGTCACCCAGCCCAATGTCGATCGGATGTGGAATATATGGAACCTATAGGAGGTAA
F G H H A N V D R H W N I W K T I G G K

1210 1220 1230 1240 1250 1260
AATAGAAAGGATTTACCGGATACGGATTGGCTTGACGCCAGCTTGGTCTTCTACGACGAG
N R K D F T D T D W L D A T F V F Y D E

1270 1280 1290 1300 1310 1320
AACAAACAACCTTGTAAAGTCAAGGTCTCGGACTGTGTCGACACTTCCAAGCTGAGATAC
N K Q L V K V K V S D C V D T S K L R Y

1330 1340 1350 1360 1370 1380
CAATATCAGGATATTTCTATTCCATGGCTACCAAAAAATACGAAGGCCAAGCGAAGAGG
Q Y Q D I P I P W L P K N T K A K A K T

1390 1400 1410 1420 1430 1440
ACCAACAAAAGTTCCAAGTCGGGAGTAGCCAAAGCGGCCGAACCTCCCAAGACGACGATC
T T K S S K S G V A K A A E L P K T T I

1450 1460 1470 1480 1490 1500
AGCAGCATCGGAGACTTCCCAAAAGCTCTTAAGTCAAGTATAGAGTGTTCGAAGG
S S I G D F P K A L N S V I R V E V P R

1510 1520 1530 1540 1550 1560
CCAAAGAAATCAAGAAGCAAGAGGAGAAAGAGGATGAGGAAGAGGTGTACTGATAAAA
P K K S R S K K E K E D E E E V L L I K

490 500 510 520 530 540
CCAGCTGCTCACTTGGTCAGCAAGAGTACTTAGCCAAGTATAAAAAGGCCATTGAGCTG
P A A H L V S K E Y L A K Y K K A I E L

550 560 570 580 590 600
CAGAAAGCTCTTCTGATGATGATCCGCGTAGTTTCAAGCAACAGGCTAATGTCCATTGC
Q K A L P D D D P R S F K Q Q A N V H C

610 620 630 640 650 660
ACCTATTGCCAAGGGGCTTATGATCAGGTTGGGTATACCGACCTAGAACTCCAGGTTTCAT
T Y C Q G A Y D Q V G Y T D L E L Q V H

670 680 690 700 710 720
GCTTCATGGCTTTTCTCCTTCCACCGTTACTATCTTCTTCAATGAGAGAATTCTT
A S W L F L P F H R Y Y L Y F N E R I L

730 740 750 760 770 780
GCAAGTTGATCGAGGATCCACCTTCGCTTGGCCTATTGGGCTGGGATTAACCTGAT
A K L I D D P T F A L P Y W A W D N P D

790 800 810 820 830 840
GGCATGTATATGCCGACCATCTATGCTAGTTCCCATCATCACTCTACGAGGAGAAGCGC
G M Y M P T I Y A S S P S S L Y D E K R

850 860 870 880 890 900
AACGCCAAGCACCTGCTCCGACTGTGATCGATCTCGACTACGATGGCACCGAACCCACA
N A K H L P P T V I D L D Y D G T E P T

910 920 930 940 950 960
ATCCCTGATGACGAATAAAACCGACAATCTGGCAATCATGTACAACAAATGTGTGCG
I P D D E L K T D N L A I M Y K Q I V S

970 980 990 1000 1010 1020
CGTCCACGACTCCTAAGCTTTTCTGTTGCTTACCCATACCGCGCGCGGATGCCATTGAC
G A T T P K L F L G Y P Y R A G D A I D

1570 1580 1590 1600 1610 1620
GSAATAGAGCTAGATAGAGAGAATTTCCGTAAGTTTGATGTGTACATCAACGACGAAGAT
G I E L D R E N F V K F D V Y I N D E D

1630 1640 1650 1660 1670 1680
TATTCACTGAGTAGGCTAAGAAATAGTCACTTTGCGAAGCTTTGTGAACGTACCACAC
Y S V S R P K N S E F A G S F V N V P H

1690 1700 1710 1720 1730 1740
AAGCATATGAAGAAATGAAGACGAAGACCAATCTGAGGTTCCGGATAAATGAGCTGTTA
K H H K E M K T K T N L R F A I N E L L

1750 1760 1770 1780 1790 1800
GAGGACTTGGGAGCCGAAGATGATGAGAGTGTGATCCGTACTATAGTCCCTCGTGTGCG
E D L G A E D D E S V I V T I V P R A G

1810 1820 1830 1840 1850 1860
GGCGATGATGTACCATTTGGTGAATTGAGATCGAGTTTGTTCGGATTGATCCCATCTT
G D D V T I G G I E I E F V S D -

1870 1880 1890 1900 1910 1920
TCAATGATTATCCATTATATGTATGTATCAGGTAAGTCACATCTTTATGTGATTAAATGGA

1930 1940 1950 1960 1970 1980
AAATGTGAGACTTCTCTGACTTTCCCGTCAAGTCTTTTATTAATTAGAGCGTTGGTTA

1990
AAAAAAAAA

FIGURE 2

```

10          20          30          40          50          60
T T T T C G A T G A G A A C A A G A A T C T T G T T A G G C T T A A T G T G A A G G A C A G T C T T G A C A C A G A
F Y D E N K N L V R V N V K D S L D T E

170        180        190        200        210        220        230        240
A A A C T A G G T T A T G C T T A T C A A A A T G T T C C C A T T C C A T G G G A A A A T G C T A A A C C T G T G C C A
K L G Y A Y Q N V P I P W E N A K P V P

250        260        270        280        290        300
G G A A G A A C A A A A G T A C C A A A A T T G G T G G A A G I T T G A G G T T A A T G A T G G A A A C T T A G A A A A
R R T K V P K L V E V E V N D G N L R K

310        320        330        340        350        360
T C A C C G A C T A T C T T A A A G T T C G A C A C A G A G T C C A A G A A A A T A C G T T A C G I T T C C A T T G
S P T I L K V R Q Q S P R K Y V T F P L

370        380        390        400        410        420
G T T T T G A A T A A T A C A G T G A C T G C T A T T G T G A A G A G G C C A A G A A A T C A A G G A G C A A G A A A
V L N N T V S A I V K R P K K S R S K K

430        440        450        460        470        480        490        500
G A G A A G G A A G A A G A G G A A G A G G T T T A G T G A T T G A G G G G A T T G A C T T T G A T A T G A A T A T A
E K E E E E E V L V I E G I E F D M N I

510        520        530        540        550        560        570        580
G C C A T T A A G T T T G A T G T T T A T A T T A A T G A T G A A G A T G C T A A A G G T T G G G C A G G G A A T A C T
A I K F D V Y I N D E D A K V G P G N T

```

```

      430          450          470          480
GAGTTTGCTGCAAGCTTTGTGAATGTCCCTCATTCTCAGATGGACACAGTAAACAAGATT
E F A G S F V N V P H S S H G H S N K I

      490          500          510          520          530          540
ATTACTTGTTTAAGACTTGGTATAACTGATTTGTGTGGAAGATTGGATGTGCAAGGCCGAT
I T C L R L G I T D L L E D L D V E G D

      550          560          570          580          590          600
GATAATATTGTGGTTACATTGGTTCCAAAATGTGGGAATGGACAAGTCAAAATCAATAAC
D N I V V T L V P K C G N G Q V K I N N

      610          620          630          640          650          660
GTCGAGATAGTGTTTGAAGATTGAAAATTTCTACCACITTTGTTATGCACCGTCTGTGTTG
V E I V F E D -

      670          680          690
AGCGACTTGAGAGGTAGATTTTATGTTTTT

```

PSR7

FIGURE 3

```

      10      20      30      40      50      60
GAGGCACATGGGGAACCTTTTCTCGCGCGGTCTGGGATCCCTCTGTTTACGCCACCATTCG
E D H G N F Y S A G R D P L F Y A H H C

      70      80      90      100     110     120
AACGTGGACGCCATGTGCAACGTTGGAAACCCCTCGGAGGCAAGCGCAAGGACCCCAACC
N V D R M W N V W K T L G G K R K D P T

      130     140     150     160     170     180
GACACCGATTGCGCTTGACGCTGAGTTTCTGTTCTACGATGAAACGCCGAGCTTGTGAGC
D T D W L D A E F L F Y D E N A E L V S

      190     200
TGTAAGTTCTGGGACAGCCCTCAAC
C K V R D S L N

```

PSRB

10 20 30 40 50 60
GAGGATATGCGGGAATTCTTCTCTCGCGGGGAGGGATCCGGTGTTTTACTCTCACCATTCC
 E D H G N F Y S A G R D P L F Y S H H S

 70 80 90 100 110 120
 AACGTGGACCGCATGTGGTCTATATATAAGATAAGTTGGAGGTACGGACATAGAAAAA
 N V D R H W S I Y K D K L G G T D I E K

 130 140 150 160 170
 TACCGACTGTGGACGCGAGGTTCTATTCTACGACGAGAAACAAGATCTTCGTGC
 Y R L L D A E F L F Y D E N K N L R

DSRP12

FIGURE 4

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| TTTTGGCGTTTCATCGATGGTACTTGCTACTCCACGAGAGAATCGTGGGAAAATTCATT | | | | | |
| F L P F H R W Y L Y F H E R I V G K F I | | | | | |
| 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| GATGATCCAACTTTTCGCTTTACCATTTGGAATTGGGACCATCCAAAAGGTATCGCTTTT | | | | | |
| D D P T F A L P Y W N W D H P K G H R F | | | | | |
| 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| CCTGCCATGTATCGTGAAGGCACTCCCTTTTCGATGTAAACCGTGACCAAGTCCAC | | | | | |
| P A M Y D R E G T S L F D V T R D Q S H | | | | | |
| 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| CGAAATGGACAGCTAATCGATCTTCGTTTTTCGGCAATGAAGTTGAAACAACCTCAACTC | | | | | |
| R N G A V I D L G F F G N E V E T T Q L | | | | | |
| 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| CAGTTGATGAGCAATAATTTAACTAATGTACCGTCAAATGGTAACTAATGCTCCCATGT | | | | | |
| Q L M S N N L T L H Y R Q M V T N A P C | | | | | |
| 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | |
| CCTCGGATGTTCTTTGGCGGGCTCTATGATCTCGGGGTTAACTGAACTCCCGGGAAGT | | | | | |
| P R M F F G G P Y D L G V N T E L P G T | | | | | |
| 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
| ATAGAAAACATCCCTCAGCGGTCTGTGCCATCTCGCTCGCTACAGTGAGAGGTTCAAAT | | | | | |
| I E N I P H G P V H I W S G T V R G S T | | | | | |
| 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |
| TTGCCCAATGGTGCAAATATCAAAACGGTGAGAAATATGGGTCAATTTTACTCAGCTGGTTTG | | | | | |
| L P N G A I S N G E N M G H N F Y S A G L | | | | | |
| 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 |
| GACCCGGTTTTCTTTTCCCATCAGCAATGTGGATCGGATGTGGAGCGAATGGAAAGCG | | | | | |
| D P V F F C H H S N V D R M W S E W K A | | | | | |
| 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 |
| ACGAGGGGAAAAGAACCGATATCACATAAAGATTGGTTGAAGTCCGAGATCTCTTTTC | | | | | |
| T G G K R T D T I T H K D W L N S E F F F | | | | | |
| 610 | 620 | 630 | 640 | 650 | 660 |
| TATGATGAAGATGAAAACCCCTACCGCTGTGAAAGTCAGACAGCTGTTTGGACACGGAAGAG | | | | | |
| Y D E N E N P Y R Y K V R D C L D L T K K | | | | | |

DSRP12

670 680 690 700 710 720
 ATGGGATACGATTACAAACCAATTGCCACACATGGCGTAACCTCAAGCCCTTAAACAAAG
 M G Y D Y K F I A T P W R N F K P L T K

730 740 750 760 770 780
 CCTTCAGCTGGAAAAGTGAATACAGCTTCCTCCGCCAGCTAGCAATGTATCCCATTTG
 P S A G K V N T A S L P P A S N V F P L

790 800 810 820 830 840
 GCTAAACTCGACAAAGCAATTTGCTTTTCCATCAATAGGCGGACTTCGTCAAGGACTCAA
 A K L D K A I S F S I N R P T S S R T Q

850 860 870 880 890 900
 CAAGAGAAAATGCAAGAGGAGATGTTGACATTCAGTAGCATAAGATATGATAACAGA
 Q E K N A Q E E M L T F S S I R Y D N R

910 920 930 940 950 960
 CGGTACATAAGGTTGATGCTTTTCGACAGTGGACAATAATGTGAATGCGAATGAGCTT
 G Y I R F D V F S N V D N N V N A N E L

970 980 990 1000 1010 1020
 GACAAGCGGAGTTTCCCGGAGTTATACAACTTTGCCACATGTTTCATAGAGCTGGTGAG
 D K A E F A G S Y T S L P H V H R A G E

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 ACTAATCATATCGCGACTGTTGATTTCAGCTGGCGATAACGGAACGTGTCGAGGATATT
 T N H I A T V D F Q L A I T E L L E D I

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 GGTITGGAAGATGAAGATATCTATTGCGGTGACTCTGGTGCACAAAGAGAGTGGTGAAGGT
 G L E D E E T I A V T L V P K R G C E G

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 ATCTCCATTGAAGGTGCGAGGATCAGTCTTCGAGATTGTTAATTAGTCTCTATTGAATCT
 I S I E G A T I S L A D C - L V S I E S

1210 1220 1230 1240 1250 1260
 GCTGAGATTACACTTTGATGGATGCTCTGTTTGTCTTCTGTTCTGTTTCTCT
 A E I T L - W M M L C F C F L V L F F P

1270 1280 1290 1300 1310 1320
 CTGTTGAATTCAGCTTTCTGCTGATTTCATTGAAGTGTATTCAAGAAATAATCACT
 L L K S A L L L D F I E V V I Q E - I S

TACAA
 Y

10 20 30 40 50 60
 TTTCTGCGCTTCGACGATCGTACTTATCTTCTACGAGAGAATTTGGGAAACTCATC
 F L P F H R W Y L Y F Y E R I L G K L I

70 80 90 100 110 120
 GATGATCCCACTTTCCGCTTACCATATTGGAATTGGGATCATCCAAAGGGCATGCGTTTA
 D D P T F A L P Y W N W D H P K G M R L

130 140 150 160 170 180
 CCTCCATGTTGGATCGTGAAGCACTTCTATTACGAGCAAGGCGTAATCAACAGTTC
 P P M F D R E G T S I Y D E R R N Q Q V

190 200 210 220 230 240
 CGTAACGGAACCCGTTATGGATCTTGGTTCATTTCGGGCAAGGTCCAAACCACTCAACTC
 R N G T V M D L G S F G D K V Q T T Q L

250 260 270 280 290 300
 CAGTTGATGCAATAATTTAACTAATGTACCGTCAATGGTAACTAATGCTCCATGT
 Q L M S N N L T L H Y R Q M V T N A P C

310 320 330 340 350 360
 CCTCTTTGTTCTTCGGTTCGCGCTTACGTTCTTGGGAATAACGTGGAAGCCCCGGGAAC
 P L L F F G A P Y V L G N N V E A P G T

370 380 390 400 410 420
 ATTGAAAACATCCCTCATATACCTGTCATATTTCGGGTGCTACAGTACGTTGCTTCAAC
 I E N I P H I P V H I W A G T V R G S T

430 440 450 460 470 480
 TTTCTAATGCTGATACGTCATACGCTGAGGATATGGTAATTTCTACTCAGCTGCTTTA
 F P N G D T S Y G E D H G N F Y S A G L

490 500 510 520 530 540
 GACCCGGTTTCTATTGCCACCAAGCAATGTGACCGTATGTGGAATGAATGGAAGCCA
 D P V F Y C H H G N V D R M W N E W K A

550 560 570 580 590 600
 ATAGGAGTAAGAGAAAGGATTATCAGAAAAAGATTGTTGAAGTCTGAGTTCTTCTTT
 I G G K R R D L S E K D W L N S E F F F

610 620 630 640 650 660
 TATGATGAAAACAAAAGCCTTACCGTGTGAAGTCCGAGACTGTTTGGACGCGAAGAAA
 Y D E N K K P Y R V K V R D C L D A K K

DIDSRACE4

670 680 690 700 710 720
 ATGGGGTACGATTACGCACCAATGCCAACTCCATGGCGTAACCTCAAAACCAAAACAAAG
 M G Y D Y A P M P T P W R N F K P K T K

730 740 750 760 770 780
 GCATCAGTAGGGAAGTGAATACAACTACACTCCCCCACTGAACAAGGTATTCCCACTC
 A S V G K V N T T T L P P V N K V F P L

790 800 810 820 830 840
 ACGAAGATGGATAAAGCCATTTCATTTCCATCAATAGGCGCTTCATCGCGGACTCAA
 T K M D K A I S F S I N R P A S S R T Q

850 860 870 880 890 900
 CAAGAGAAAATGAACAAGAGGAGATGTTAAGCTTCGATAACATAAAATATGATAATAGA
 Q E K N E Q E E M L T F D N I K Y D N R

910 920 930 940 950 960
 GGGTATATAAGGTTGATGCTTTCTGAACGTTGGATAACAATGTGAATGCGAATGAGCTT
 G Y I R F D V F L N V D N N V N A N E L

970 980 990 1000 1010 1020
 GATAAGGCAGAGTTCCGCGGGAGTTATACTAGTTTGGCCACATGTTACAGAGTTGGCGAG
 D K A E F A G S Y T S L P H V H R V G E

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 AATGATCATACCGCGACTGTTACTTTCCAGCTGGCGATAACAGAACTGTTGGAGGACATT
 N D H T A T V T F Q L A I T E L L E D I

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 GGTITGGAAGATGAAGAGACTATTGCGGTGACTCTGGTACCAAGAAAGGTGGTGAAGGT
 G L E D E E T I A V T L V P K K G G E G

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 ATCTCCATTGAAAATGTGGAGATCAAGCTTCTGGATTGTTAAGTACGTTCTCAATTGAAT
 I S I E N V E I K L L D C - V R S Q L N

1210 1220 1230 1240 1250 1260
 CTGCTGAGATTACAACTTTCATATGTTTTTACTTTTGTCTTTCATGTAACCTTTCTCTG
 L L R L Q L - Y V F Y F C F S M - L F L

1270 1280 1290 1300 1310
 TTGAATCAGCTTGATGCTGATTTCTTGGAGTGTGTTACTCAATAAATAACA
 L K S A - C L I S L E L L F T N K I

10 20 30 40 50 60
 TTTTTTTTATCAAAGCTAGCAATAATGGCAAGCTGTGCAATAGTGTAGTACATCC
 M A S L C N S C S T S

70 80 90 100 110 120
 CTCAAACCTCTTTTACTTCTCTCTCCACTTCTTTAACTTCCACTCCTAAACCTCTCAA
 L K T P F T S S S T S L T S T P K P S Q

130 140 150 160 170 180
 CTTTTCATCCATGAAAACGTAACCAATGTTCAAAGTTCATGATGGTTACCAATAAT
 L F I H G K R N Q M F K V S C H V T N N

190 200 210 220 230 240
 AACGGTGACCAAAACCAAAACGTTGAACCAATCTGTTGATCGAAGAAATGTTCTCTT
 N G D Q N Q N V E T N S V D R R N V L L

250 260 270 280 290 300
 GGTATTAGTGTCTTTATGCTGTTGCTAATGCTATACCATAGTGCATCGCTACTCCA
 G L G G L Y G V A N A I P L A A S A T P

310 320 330 340 350 360
 TCTCCACTCTGATCTCTGTTGTGATATACGAGGATTAACGAACTCATGTGGTC
 S P P P D L S S C S I A R I N E T H V V

370 380 390 400 410 420
 CCGTACAGTTGTTGCGCGCTAAGCCTGATGATATGGAAGAAAGTTCGATTAACAAGTTC
 P Y S C C A P K P D D M E K V P Y Y K F

430 440 450 460 470 480
 CCTTCTATGACTAAGCTCCGTTGCTGCTGCTGCTCATGAAGCTAATGAGGAGTATATT
 P S M T K L R V R Q P A H E A N E E Y I

490 500 510 520 530 540
 GCCAAGTCAATTTGCGGTTAGCAAGATGAGGATCTTGATAAGACACACACTTAAAG
 A K Y N L A V S K M R D L D K T Q P L N

550 560 570 580 590 600
 CCTATTGTTTAAAGCAACAGCTAATATACATTGCTTATTGTAACGGTGTCTATAGA
 P I G F K Q A N I H C A Y C N G A Y R

610 620 630 640 650 660
 ATTGGTGGCAAGAGTTACAAGTTCAATATTCTGCTTTCTTCCCGTTCCATAGATCG
 I G G K E L Q V H N S W L F F F F H R W

平成 6年 1月17日

通

特許庁長官 麻生 渡 殿

1. 特許出願の表示

PCT/AU92/00356

2. 発明の名称

ポリフェノールオキシダーゼ遺伝子

3. 特許出願人

住 所 オーストラリア連邦オーストラリアン・キャピタル・
テリトリー 2601, キャンベル, ライムストーン・
アベニュー (番地なし)
名 称 コモンウェルス・サイエンティフィック・アンド・
インダストリアル・リサーチ・オーガナイゼーション

4. 代理人

住 所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新大手町ビル 206区
電 話 3270-6641~6646
氏 名 (2770) 弁護士 湯 浅 哉 三

5. 補正書の提出日

平成 5年 5月 4日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の翻訳文

1通



34条補正

(差し替え用紙第2、3、3a頁の翻訳文: 原翻訳文第1頁26行~第3頁25行と差し替える)

これらの場合、PPOの量を増大させて、望ましい程度の褐変または風味成分の変化を生じさせることが望ましいことがある。

正常な植物の成長および発育におけるPPOの役割は、現在のところ理解されていない。この酵素の増大した濃度が植物病原体に対する増大した耐性と関連している場合が多数存在している。当然の結果として、PPO活性の水準を増大させる植物の遺伝子操作は、病原体および有害生物に対する有用な耐性を与えることができる。

グレープバイン (grape vine) のPPO遺伝子は、成熟タンパク質のN末端の上流の追加の103アミノ酸をコードする。この領域は、葉緑体トランシットペプチドの性質を有し、しかもタンパク質が葉緑体中に引き入れられ且つ成熟PPOタンパク質を生産するように処理されるように目的を絞るためのものであると考えられる。この遺伝子による植物の形質転換は、したがって、他種においてグレープバインPPOの正しい標的および成熟を生じ且つこれらの組織の色素体中で活性グレープバインPPO酵素の蓄積を引起すことができる。

本明細書中で用いられる「PPOをコードしている遺伝子」、「PPOをコードする遺伝子」または「PPO遺伝子」は、PPO遺伝子またはそれと実質的に相同の配列を意味すると理解されるべきである。

本発明の第一の態様において、植物ポリフェノールオキシダーゼ (PPO) 活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを提供する。

DND配列は、トランシットペプチドをコードする植物PPO遺伝子のブレ配列を含んでいてよい。

DND配列は修飾されていてよい。DNA配列は、植物PPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードする配列またはそのフラグメントを含んでいてよ

い。

DNA配列は、触媒開裂部位を更に含んでいてよい。

或いは、ブレ配列は、植物PPO活性を有するポリペプチドを他の細胞区分に向けるように他の標的配列によって置き換えることができる。

DNA配列は、図1に図示したような、推定上の葉緑体トランシット配列および成熟グレープバインPPOタンパク質を含んでいてよい。

DNA配列は、図2に図示したような、ソラマメの葉のPPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含んでいてよい。

DNA配列は、図3に図示したような、リンゴ果実PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含んでいてよい。

DNA配列は、図4に図示したような、ジャガイモ塊茎PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含んでいてよい。

本発明のもう一つの態様において、植物PPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードする配列を含むDNA配列またはそのフラグメントを提供する。

本発明のもう一つの態様において、植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含む組換えDNAプラスミドを製造する方法であって、

PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメント; および

プラスミド発現ベクターを提供し; そして

該DNA配列および該プラスミド発現ベクターを反応させて、該DNA配列を該プラスミド発現ベクター中に配置することを含む上記方法を提供する。

PPOをコードするDNA配列は、例えば、植物試料から単離されたポリ阿德ニル化RNAから生成することができる。植物は、リンゴ、ジャガイモ、ブドウおよび豆から選択することができる。好ましくは、植物試料は、スルタナブドウ果実、ソラマメの葉、リンゴの外皮若しくは皮層またはジャガイモ塊茎から単離される。

PPOをコードするDNA配列を提供するために、本発明の好ましい態様において、組換えDNAプラスミドの製造方法は、

植物PPO活性を有するポリペプチド源を提供し；

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするポリアデニル化RNAをそこから単離し；そして

コピーDNA (cDNA) を構築するように該ポリアデニル化RNAを処理する予備工程を含むことができる。

ポリアデニル化RNAの単離は、オリゴ-dTスパンカラムを用いて実施することができる。

(差し替え用紙第5、6、6a頁の翻訳文；原訳論文第4頁22行～第7頁1行と差し替える)

或いは、本発明のこの態様にしたがってcDNAを構築するようにポリアデニル化RNAを処理する工程は、

該ポリアデニル化RNAを逆転写酵素およびPPO特異的プライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し；

そのように生成されたcDNAをターミナルdトランスフェラーゼで処理して、ポリアデノシン尾部配列を該cDNAの3'末端に結合し；そして

そのように生成されたポリアデニル化cDNAをPCRによって増幅させることを含むことができる。

ポリアデニル化RNAを逆転写酵素で処理する工程は、ブドウPPOに関して配列

5'-AATCTTTTGTTGACTGGCG

を有するPPO特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いることができるまたは該PPO特異的プライマーはジャガイモ塊茎PPOに関して配列

5' GACGGTACATTAGTCTTAAT

を有するオリゴヌクレオチドプライマーである。

cDNAを増幅させる工程は、配列

5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTT

を有するオリゴヌクレオチドアダプタープライマーおよびブドウPPOに関して配列

5'-ACCATCAGGCACGGTGGCGG

またはジャガイモ塊茎PPOに関して配列

5'-TGCTCATCACTGGAGTTGAG

を有するPPO特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いることができる。

二本鎖cDNAのクローニングのためのプラスミド発現ベクターは任意の適当な種類であってよい。プラスミドベクターブルースクリプト

(Bluescript) SK⁺は適当であることが分かっている。

クローニング工程は任意の適当な形式をとってよい。好ましい形式はcDNAを、例えば、クレノウフラグメントでプラント末端付きにし；そのように生成されたcDNAを、例えば、アガロースゲル上で分別し；予想の寸法のフラグメントを、例えば、ゲルから単離し；そして該フラグメントを適当な制限酵素部位、例えば、ブルースクリプトSK⁺ベクターのHindIIIまたはEcoRI部位に連結することを含むことができる。

このように生成されたクローンを試験するために、適当な微生物をプラスミド発現ベクターによって形質転換することができ、該微生物を培養し、そしてそこにおいてコードされたポリペプチドを発現させることができる。微生物大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5は適当であることが分かっている。

本発明のもう一つの態様において、植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含む組換えDNAプラスミドであって、単細胞生物において複製され、転写され、そして翻訳されることができる上記プラスミドを提供する。

プラスミド発現ベクターは任意の適当な種類であってよい。組換えプラスミドは、PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列の上流の構成的プロモーター要素を含むことができる。

本発明のもう一つの態様において、植物組織中のPPO活性の水準を低下させる方法であって、

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする修飾遺伝子またはそのフラグメントを含むDNA構築物；および

植物試料を提供し；そして

該DNA構築物を該植物試料中に導入して形質転換した植物を製造することを含む上記方法を提供する。

DNA構築物は、植物PPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードしている配列またはそのフラグメントを含むことができる。DNA構築物は、植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子またはそのフラグメントを含み、触媒開裂部位を組込んでいることができる。

植物は任意の適当な種類であってよい。好ましい態様において、植物は、グレ

ーブリン、ジャガイモ、リンゴおよび豆を含む群より選択することができる。

本発明のもう一つの態様において、植物組織中のPPO活性の水準を増大させる方法であって、

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子またはそのフラグメントを含むDNA構築物；および

植物試料を提供し；そして

該DNA構築物を該植物試料中に導入して形質転換した植物を製造することを含む上記方法を提供する。

DNA構築物は、植物PPO遺伝子のブレ配列をコードしているDNA配列またはそのフラグメントを含むことができる。

植物は任意の適当な種類であってよい。好ましい態様において、植物は、タバコ、ソラマメ、トマト、茶、コーヒーおよびココアから成る群より選択することができる。

(差し替え用紙第8、9、10、10a頁の翻訳文：原翻訳文第7頁28行～第10頁20行と差し替える)

本発明のもう一つの態様において、形質転換した植物であって、正常なPPO遺伝子の発現を変更しうる合成遺伝子を含む上記植物を提供する。

植物は任意の適当な種類であってよい。好ましい態様において、植物は、グレープバイン、ジャガイモ、リンゴ、タバコ、豆、モモ、ナシおよびアンズから成る群より選択することができる。

本発明のもう一つの態様において、PPOをコードしている配列またはそのフラグメントを含む植物用ワクチンを提供する。

本発明のもう一つの態様において、植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含むDNAプローブを提供する。

プローブは、任意の適当な方式で標識することができる。放射性標識または非放射性標識を用いることができる。便宜上、プローブは、適当なプラスミドベクター中のクローン化されたインサートの形で提供することができる。

グレープバインPPO配列を用いて、この遺伝子を他の種から得るようにPCRで用いるための一般的な目的オリゴヌクレオチドプライマーを設計することができる。植物PPOタンパク質は補欠分子族として銅を含むことが知られており、そしてヘモシアニンおよびチロシナーゼタンパク質からの配列に対して同族を示す。これらのタンパク質上の銅結合性部位に対応するブドウタンパク質配列の二つの領域が識別された。これらの領域は種々の生物間で明らかに保存されるので、それらは、他の植物PPO遺伝子を得るようにプローブおよびプライマーを設計するのに適している。

したがって、本発明の更にもう一つの態様において、PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

cDNAまたはゲノムライブラリー；および

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含むDNAプローブを提供し；そして

発現ライブラリー；および

PPO活性を有する精製ポリペプチドに対して生じた多クローン性抗体を提供し；そして

該多クローン性抗体と該発現ライブラリーとを反応させて、PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを有するクローンを識別することを含む上記方法を提供する。

本発明のもう一つの態様において、PPOタンパク質の精製法であって、

植物試料；

デタージェント；および

1種類またはそれ以上のクロマトグラフィーカラムを提供し；

該植物試料を該デタージェントで抽出し；

そのように生成された抽出物を硫酸アンモニウムで処理し；そして

そのように生成された抽出物を、それをクロマトグラフィーカラムに通すことによって分別することを含む上記方法を提供する。

植物試料は任意の適当な種類であってよい。植物試料はグレープバイン果実であってよい。この組織は高濃度のPPOを含み、成熟ブドウ果実の果汁中の大部分のPPO活性は固形物によるものであり、遠心分離によって果汁から分離した後にデタージェントによって可溶化することができる。植物試料は豆の葉であってよい。

デタージェントは陽イオン性であってよい。臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム(CTAB)デタージェントは適当であることが分かっている。

クロマトグラフィーカラムはセファロース基材であってよい。3種類のクロマトグラフィーカラムを用いることができる。Q-セファロースに続いてフェニル-セファロース、次にヒドロキシルアパタイトが適当であることが分かっている。

本発明のもう一つの態様において、N末端アミノ酸配列

APIQAPDISKCGTATVPDGVTP

を有する実質的に純粋な状態の植物PPO活性を有するポリペプチドを提供する。

ここで、本発明を実施例および図面に関して更に充分に記載する。しかしながら、以下の説明が単に例示するためのものであることは理解されるべきであり、

該プローブをゲノムライブラリーとハイブリッド形成させて、該DNA配列を有するクローンを識別することを含む上記方法を提供する。

DNAプローブは、異種間に高度に保存されるリンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子のフラグメントを含むDNA配列を含むことができる。

DNAプローブは、植物種からの全cDNA；および

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子と特異的にハイブリッド形成し且つ異種間に高度に保存されるリンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子の配列を含む2種類またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを提供し；そして

PCRを行なって、植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを増幅させることを含む方法によって製造することができる。

オリゴヌクレオチドプライマーは、植物PPO活性を有するポリペプチド上の銅結合性部位に対応するDNA配列を含むことができる。

本発明のもう一つの態様において、PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

植物種から単離されたmRNA；

ポリ-dTアダプタープライマー；および

2種類またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを提供し；

mRNAを逆転写酵素およびアダプタープライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し；そして

そのように生成されたcDNAを、オリゴヌクレオチドプライマーおよびポリメラーゼ連鎖反応を用いて増幅させることを含む上記方法を提供する。

好ましい態様において、オリゴヌクレオチドプライマーは、リンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子配列に基づくことができる。

本発明のもう一つの態様において、PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

いかなる場合にも上記の本発明の一般性を制限するものとしてとるべきではない。

図面において、

図1：

推定上の葉緑体トランシット配列および成熟グレープバインPPOタンパク質双方をコードする複合完全長GPO1 cDNAヌクレオチド配列および誘導タンパク質配列。

翻訳開始部位をボールド体で示し、成熟タンパク質のN末端に星印を付ける。

(原請求の範囲を以下の新請求の範囲に全文差し替える：原請求文第23～28頁)

請求の範囲

1. 植物ポリフェノールオキシゲナーゼ (PPO) 活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメント。
2. トランシットペプチドをコードする植物PPO遺伝子のブレ配列を含むDNA配列。
3. トランシットペプチドをコードする植物PPO遺伝子のブレ配列を含む請求項1に記載のDNA配列。
4. 植物PPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードする配列またはそのフラグメントを含む請求項1に記載のDNA配列。
5. 植物PPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードする配列を含むDNA配列またはそのフラグメント。
6. 触媒開裂部位を組込んでいる請求項1に記載のDNA配列。
7. ブレ配列が、植物PPO活性を有するポリペプチドを他の細胞区分に向けてるように他の標的配列によって置き換えられている請求項3に記載のDNA配列。
8. 図1に図示したような、推定上の葉緑体トランシットペプチド配列および成熟グレープバインPPOポリペプチドをコードする配列を含む請求項3に記載のDNA配列。
9. 図2に図示したような、ソラマメの葉のPPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む請求項1に記載のDNA配列。
10. 図3に図示したような、リンゴ果実のPPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む請求項1に記載のDNA配列。
11. 図4に図示したような、ジャガイモ塊茎のPPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む請求項1に記載のDNA配列。
12. 植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはその

5'-CCATTCAGGCCICCGATATTCIAAGTGTGG;

豆cDNAの増幅用に用いられる場合に配列

5'-GGGATCTT[CT]TA[CT]GA[CT]GA[GA]AA[CT]AA;

リンゴcDNAの増幅用に用いられる場合に配列

(5'-GCGAATTCGA[AC]GA[TC]ATGGGIAA[TC]TT[TC]TA);

そしてジャガイモcDNAの増幅用に用いられる場合に配列

GEN3: (5'-GCGAATCTT[TC]TC]TTCITT[TC]CA[TC][AC]G)

GEN7: (5'-GCGAATTCAA[TC]GTIGA[TC][AC]GIATGTGG)

を有する請求項18に記載の方法。

20. ポリアデニル化RNAを処理する工程が、

該ポリアデニル化RNAを逆転写酵素およびPPO特異的プライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し;

そのように生成されたcDNAをターミナルdトランスフェラーゼで処理して、ポリアデニン尾部配列を該cDNAの3'末端に結合し;そして

そのように生成されたポリアデニル化cDNAを、PCRを用いて増幅させることを含む請求項15に記載の方法。

21. PPO特異的プライマーが、ブドウPPOに関して配列

5'-AATCTTTGTGGTACTGGCC

を有するオリゴヌクレオチドプライマーでありまたは該PPO特異的プライマーが、ジャガイモ塊茎PPOに関して配列

5'GACGGTACATTAGTCTTAAAT

を有するオリゴヌクレオチドプライマーである請求項20に記載の方法。

22. cDNAを増幅させる工程が、配列

5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT

を有するオリゴヌクレオチドアダプタープライマーおよびブドウPPOに関して配列

5'-ACCATCAGGCACGGTGGCGG

またはジャガイモ塊茎PPOに関して配列

5'-TGCTCATCACTGGAGTTGAG

のフラグメントを含む組換えDNAプラスミドを製造する方法であって、

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメント;および

プラスミド発現ベクターを提供し;そして

該DNA配列および該プラスミド発現ベクターを反応させて、該DNA配列を該プラスミド発現ベクター中に配置することを含む上記方法。

13. DNA配列を、植物試料から単離されたポリアデニル化RNAから生成する請求項12に記載の方法。

14. 植物試料を、リンゴ、ジャガイモ、ブドウおよび豆から選択する請求項13に記載の方法。

15. 植物PPO活性を有するポリペプチド源を提供し;

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするポリアデニル化RNAをそこから単離し;そして

コピーDNA (cDNA) を構築するように該ポリアデニル化RNAを処理する予備工程を含む請求項13に記載の方法。

16. ポリアデニル化RNAを処理する工程が、

該ポリアデニル化RNAを逆転写酵素およびアダプタープライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し;そして

そのように生成されたcDNAを、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて増幅させることを含む請求項15に記載の方法。

17. アダプタープライマーが、配列

5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT

を有するオリゴヌクレオチドアダプターである請求項16に記載の方法。

18. cDNAを増幅させる工程が、配列

5'-GACTCGAGTCGACATCG

を有するアダプタープライマーおよび5'末端プライマーを用いる請求項17に記載の方法。

19. 5'末端プライマーが、ブドウcDNAの増幅用に用いられる場合に配列

を有するPPO特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いる請求項21に記載の方法。

23. プラスミド発現ベクターがプラスミドベクターブルースクリプトSK⁺であり且つDNA配列がcDNA配列である請求項22に記載の方法。

24. DNA配列をプラスミド発現ベクター中に配置する工程が、

cDNAをプラント末端付きにし;

そのように生成されたプラント末端付きcDNAを分別し;

予想の寸法のフラグメントを単離し;そして

該フラグメントをブルースクリプトSK⁺ベクターの適当な制限酵素部位に連結することを含む請求項23に記載の方法。

25. 植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含む組換えDNAプラスミドであって、単細胞生物において複製され、転写され、そして翻訳されることができる上記プラスミド。

26. DNA配列の上流の構成的プロモーター要素を含む請求項25に記載の組換え体プラスミド。

27. DNA配列が、ブドウ、豆、リンゴまたはジャガイモ塊茎のPPO活性を有するポリペプチドをコードする請求項26に記載の組換え体プラスミド。

28. 植物組織中のPPO活性の水準を低下させる方法であって、

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする修飾遺伝子またはそのフラグメントを含むDNA構築物;および

植物試料を提供し;そして

該DNA構築物を該植物試料中に導入して形質転換した植物を製造することを含む上記方法。

29. DNA構築物が、植物PPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードする配列またはそのフラグメントを含む請求項28に記載の方法。

30. DNA構築物が、植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子またはそのフラグメントを含み、触媒開裂部位を組込んでいる請求項28に記載の方法。

31. 植物試料を、グレープバイン、ジャガイモ、リンゴおよび豆から選択さ

| DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|-------------------------------------|--|-----------------------|
| Category* | Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to Class No. |
| A | Darwest WFAT Online Abstract Accession no. 87-254829/42, 77.A, 62205783 (AJINOMOTO KK) 6 March 1986 (06.03.86) | |

Form PCT/ISA/210 (continuation of annex sheet)(July 1992)

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

| Parent Document Cited in Search Report | | Patent Family Member | | | |
|--|----------|----------------------|---------------------|----|---------|
| AU | 81547/87 | CA WO | 1293940 85/02372 | EP | 290504 |
| | | | | US | 4898814 |
| END OF ANNEX | | | | | |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex)(July 1992) optional

フロントページの続き

(72)発明者 ドライ, イアン・バリー
オーストラリア連邦サウス・オーストラリ
ア州5039, メルローズ・パーク, キングス
トン・アベニュー 111

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 1999年04月16日 (16. 04. 1999) 金曜日 16時04分47秒

| | | |
|-----------|---|--|
| 0 | 受理官庁記入欄 | |
| 0-1 | 国際出願番号 | |
| 0-2 | 国際出願日 | |
| 0-3 | (受付印) | |
| 0-4 | この特許協力条約に基づく国際出願願書(様式 - PCT/RO/101)は、右記によって作成された。 | PCT-EASY Version 2.81 (updated 01.01.1999) |
| 0-5 | 申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。 | |
| 0-6 | 出願人によって指定された受理官庁 | 日本国特許庁 (RO/JP) |
| 0-7 | 出願人又は代理人の書類記号 | G837-PCT |
| I | 発明の名称 | オーロン合成活性を有する蛋白質をコードする遺伝子 |
| II | 出願人 | 出願人である (applicant only) |
| II-1 | この欄に記載した者は | 米国を除くすべての指定国 (all designated States except US) |
| II-2 | 右の指定国についての出願人である。 | サントリー株式会社 SUNTORY LIMITED 530-8203 日本国 大阪府 大阪市北区堂島浜 2丁目1番40号 1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-8203 Japan |
| II-4ja | 名称 | |
| II-4en | Name | |
| II-5ja | あて名: | |
| II-5en | Address: | |
| II-6 | 国籍(国名) | 日本国 JP |
| II-7 | 住所(国名) | 日本国 JP |
| III-1 | その他の出願人又は発明者 | 出願人及び発明者である (applicant and inventor) |
| III-1-1 | この欄に記載した者は | 米国のみ (US only) |
| III-1-2 | 右の指定国についての出願人である。 | 種原 圭子 SAKAKIBARA, Keiko 617-0002 日本国 京都府 向日市寺戸町西田中瀬 3-1-327 3-1-327, Nishitanakase, Terado-cho, Muko-shi, Kyoto 617-0002 Japan |
| III-1-4ja | 氏名(姓名) | |
| III-1-4en | Name (LAST, First) | |
| III-1-5ja | あて名: | |
| III-1-5en | Address: | |
| III-1-6 | 国籍(国名) | 日本国 JP |
| III-1-7 | 住所(国名) | 日本国 JP |



特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 1999年04月16日 (16. 04. 1999) 金曜日 16時04分47秒

G837-PCT

| | | |
|------------------|----------------------------|---|
| III-2 III-2-1 | その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は | 出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only) |
| III-2-2 | 右の指定国についての出願人である。 | |
| III-2-4ja | 氏名(姓名) | 福井 祐子 |
| III-2-4en | Name (LAST, First) | FUKUI, Yuuko |
| III-2-5ja | あて名: | 618-0014 日本国 大阪府 三島郡島本町水無瀬 2-8-2-907 |
| III-2-5en | Address: | 2-8-2-907, Minase, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618-0014 Japan |
| III-2-6 | 国籍(国名) | 日本国 JP |
| III-2-7 | 住所(国名) | 日本国 JP |
| III-3 III-3-1 | その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は | 出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only) |
| III-3-2 | 右の指定国についての出願人である。 | |
| III-3-4ja | 氏名(姓名) | 田中 良和 |
| III-3-4en | Name (LAST, First) | TANAKA, Yoshikazu |
| III-3-5ja | あて名: | 520-0246 日本国 滋賀県 大津市仰木の里 2-7-4 |
| III-3-5en | Address: | 2-7-4, Oginosato, Otsu-shi, Shiga 520-0246 Japan |
| III-3-6 | 国籍(国名) | 日本国 JP |
| III-3-7 | 住所(国名) | 日本国 JP |
| III-4 III-4-1 | その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は | 出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only) |
| III-4-2 | 右の指定国についての出願人である。 | |
| III-4-4ja | 氏名(姓名) | 久住 高章 |
| III-4-4en | Name (LAST, First) | KUSUMI, Takaaki |
| III-4-5ja | あて名: | 564-0073 日本国 大阪府 吹田市山手町 2-12-21-402 |
| III-4-5en | Address: | 2-12-21-402, Yamate-cho, Suita-shi, Osaka 564-0073 Japan |
| III-4-6 | 国籍(国名) | 日本国 JP |
| III-4-7 | 住所(国名) | 日本国 JP |

特許協力条約に基づく国際出願願書

3/5

G837-PCT

原本(出願用) - 印刷日時 1999年04月16日 (16. 04. 1999) 金曜日 16時04分47秒

| | | |
|------------------|---|---|
| III-5 III-5-1 | その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は | 出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only) |
| III-5-2 | 右の指定国についての出願人である。 | |
| III-5-4ja | 氏名(姓名) | 水谷 正子 |
| III-5-4en | Name (LAST, First) | MIZUTANI, Masako |
| III-5-5ja | あて名: | 615-8086 日本国 京都府 京都市西京区桂乾町 5 3 - 6 0 |
| III-5-5en | Address: | 53-60, Katsurainui-cho, Nishikyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 615-8086 Japan |
| III-5-6 | 国籍(国名) | 日本国 JP |
| III-5-7 | 住所(国名) | 日本国 JP |
| III-6 III-6-1 | その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は | 出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only) |
| III-6-2 | 右の指定国についての出願人である。 | |
| III-6-4ja | 氏名(姓名) | 中山 亨 |
| III-6-4en | Name (LAST, First) | NAKAYAMA, Toru |
| III-6-5ja | あて名: | 981-3202 日本国 宮城県 仙台市泉区北高森 2 - 1 - 3 0 5 |
| III-6-5en | Address: | 2-1-305, Kitatakamori, Izumi-ku, Sendai-shi, Miyagi 981-3202 Japan |
| III-6-6 | 国籍(国名) | 日本国 JP |
| III-6-7 | 住所(国名) | 日本国 JP |
| IV-1 | 代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。 | 代理人 (agent) |
| IV-1-1ja | 氏名(姓名) | 石田 敬 |
| IV-1-1en | Name (LAST, First) | ISHIDA, Takashi |
| IV-1-2ja | あて名: | 105-8423 日本国 東京都 港区虎ノ門 三丁目5番1号虎ノ門3 7 森ビル 青和特許法律事務所 |
| IV-1-2en | Address: | A. AOKI, ISHIDA & ASSOCIATES Toranomom 37 Mori Bldg., 5-1, Toranomom 3-chome, Minato-ku, Tokyo 105-8423 Japan |
| IV-1-3 | 電話番号 | 03-5470-1900 |
| IV-1-4 | ファクシミリ番号 | 03-5470-1911 |
| IV-2 | その他の代理人 | 筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent) |
| IV-2-1 | Name(s) | 福本 積; 西山 雅也 |

特許協力条約に基づく国際出願願書

G837-PCT



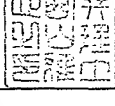
原本（出願用） - 印刷日時 1999年04月16日（16. 04. 1999）金曜日 16時04分47秒

| | | | |
|---------|---|---|-------------------|
| V | 国の指定 | | |
| V-1 | 広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。) | EP: AT/BE/CH&LI CY/DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU/MC/NL/PT/SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国 である他の国 | |
| V-2 | 国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。) | AU CA CN IL JP NZ US | |
| V-5 | 指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて 、規則4.9(b)の規定に基づき、 特許協力条約のもとで認められ る他の全ての国の指定を行う。 ただし、V-6欄に示した国の指 定を除く。出願人は、これらの 追加される指定が確認を条件と していること、並びに 優先日から15月が経過する前 にその確認がなされない指定は 、この期間の経過時に、出願人 によって取り下げられたものと みなされることを宣言する。 | | |
| V-6 | 指定の確認から除かれる国 | なし (NONE) | |
| VI-1 | 先の国内出願に基づく優先権 主張 | | |
| VI-1-1 | 先の出願日 | 1998年04月17日 (17. 04. 1998) | |
| VI-1-2 | 先の出願番号 | 特願平10-107296 | |
| VI-1-3 | 国名 | 日本国 JP | |
| VII-1 | 特定された国際調査機関 (ISA) | 日本国特許庁 (ISA/JP) | |
| VIII | 照合欄 | 用紙の枚数 | 添付された電子データ |
| VIII-1 | 願書 | 5 | - |
| VIII-2 | 明細書 (配列表を除く) | 32 | - |
| VIII-3 | 請求の範囲 | 2 | - |
| VIII-4 | 要約 | 1 | sty837_.txt |
| VIII-5 | 図面 | 6 | - |
| VIII-6 | 明細書の配列表 | 14 | - |
| VIII-7 | 合計 | 60 | |
| VIII-8 | 添付書類 | 添付 | 添付された電子データ |
| VIII-8 | 手数料計算用紙 | ✓ | - |
| VIII-15 | 計算機読取可能な媒体による効 い付 及び/又はアミノ酸配列リスト | | 別個のフレキシブルディ スク |
| VIII-16 | PCT-EASYディスク | - | フレキシブルディスク |
| VIII-17 | その他 | 納付する手数料に相当す る特許印紙を貼付した書 面 | - |
| VIII-17 | その他 | 陳述書 | - |
| VIII-17 | その他 | フレキシブルディスクの 記録形式等の情報を記載 した書面 | - |
| VIII-18 | 要約書とともに提示する図の 番号 | | |
| VIII-19 | 国際出願の使用言語名: | 日本語 (Japanese) | |

特許協力条約に基づく国際出願願書

G837-PCT

原本（出願用） - 印刷日時 1999年04月16日（16. 04. 1999）金曜日 16時04分47秒

| | | | |
|--------|----------|-------|--|
| IX-1 | 提出者の記名押印 | |  |
| IX-1-1 | 氏名(姓名) | 石田 敬 | |
| IX-2 | 提出者の記名押印 | |  |
| IX-2-1 | 氏名(姓名) | 福本 積 | |
| IX-3 | 提出者の記名押印 | |  |
| IX-3-1 | 氏名(姓名) | 西山 雅也 | |

受理官庁記入欄

| | | |
|--------|--|--------|
| 10-1 | 国際出願として提出された書類の実際の受理の日 | |
| 10-2 | 図面： | |
| 10-2-1 | 受理された | |
| 10-2-2 | 不足図面がある | |
| 10-3 | 国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であつてその後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日） | |
| 10-4 | 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日 | |
| 10-5 | 出願人により特定された国際調査機関 | ISA/JP |
| 10-6 | 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない | |

国際事務局記入欄

| | | |
|------|-----------|--|
| 11-1 | 記録原本の受理の日 | |
|------|-----------|--|

PCT

EP



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

| | | |
|----------------------------|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 G837-PCT | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。 | |
| 国際出願番号 PCT/JP99/02045 | 国際出願日 (日.月.年) 16.04.99 | 優先日 (日.月.年) 17.04.98 |
| 出願人(氏名又は名称) サントリー株式会社 | | |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N15/53, C12N15/29, C12N9/02, C12P17/04, C07K1/22,
C12N5/14, A01H5/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N15/53, C12N15/29, C12N9/02, C12P17/04, C07K1/22,
C12N5/14, A01H5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用する電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X | JP, 7-501686, A (コモンウェルス・サイエンティフィック・アンド ・インダストリアル・リサーチ・オーガナイゼーション) 23. 2月. 1995 (23. 02. 95) & WO, 9302195, A1 & AU, 9223316, A & EP, 599868, A1 & NZ, 243594, A | 1-17 |
| X | ESAKA, M. et al. "Molecular cloning and nucleotide sequence of full-length cDNA for ascorbate oxidase from cultured pumpkin cells", Eur. J. Biochem. (1990) 第191巻, 第3号 p. 537-541 | 1-17 |
| X | SHAHAR, T. et al. "The tomato 66.3-kD polyphenoloxidase gene: molecular identification and developmental expression" The Plant Cell (1992) 第4巻, 第2号 p. 135-147 | 1-17 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 07. 99

国際調査報告の発送日

21.07.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

4 B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| X | JOY, R. W. et al. "Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of <i>Phytolacca americana</i> ", Plant Physiol. (1995) 第107巻, 第4号 p. 1083-1089 | 1-17 |

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-501686

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)2月23日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

序内整理番号

F I

C 1 2 N 15/09

Z N A

A 0 1 H 1/00

Z N A A 8502-2B

C 1 2 N 9/02

9359-4B

9050-4B

C 1 2 N 15/ 00

Z N A A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願平5-502480
(86) (22) 出願日 平成4年(1992)7月16日
(85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)1月17日
(86) 国際出願番号 PCT/AU92/00356
(87) 国際公開番号 WO93/02195
(87) 国際公開日 平成5年(1993)2月4日
(31) 優先権主張番号 PK7248
(32) 優先日 1991年7月17日
(33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)
(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), AU, CA, JP, US

(71) 出願人 コモンウェルス・サイエンティフィック・
アンド・インダストリアル・リサーチ・オ
ーガナイゼーション
オーストラリア連邦オーストラリアン・キ
ャピタル・テリトリリー 2601, キャンベ
ル, ライムストーン・アベニュー (番地な
し)
(72) 発明者 ロビンソン, シモン・ピアース
オーストラリア連邦サウス・オーストラリ
ア州5061, ハイド・パーク, オベイ・アベ
ニュー 74
(74) 代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外5名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリフェノールオキシダーゼ遺伝子

(57) 【要約】

ポリフェノールオキシダーゼ (PPO) 活性を有する
ポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列また
はそのフラグメント。

21. プラスミド発現ベクターがプラスミドベクタープラスリプトSK⁺であり、DNA配列がcDNA配列であり、DNA配列をプラスミド発現ベクター中に配置する工程が、
- 該cDNAをクローニングフラグメントでプラント末端付しに；
そのように生成されたcDNAをアガロースゲル上で分離し；
予想の寸法のフラグメントをゲルから単離し；そして
該フラグメントをプラスリプトSK⁺ベクターのHindIIIまたはE

21. コロリ部位に連結することを含む請求項10に記載の方法。
 22. PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含む組換えDNAプラスミドであって、早期胎生動物において複製され、転写され、そして翻訳されることができる上記プラスミド。
 23. DNA配列の上流の構成的プロモーター要素を含む請求項22に記載の組換え体プラスミド。
 24. DNA配列が、ブドウ、豆、リンゴまたはジャガイモ機葉のPPO活性を有するポリペプチドをコードする請求項23に記載の組換え体プラスミド。
 25. 植物組織中のPPO活性の水準を低下させる方法であって、修飾PPO遺伝子またはそのフラグメントを含むDNA構築物；および植物試料を提供し；そして
 該DNA構築物を該植物試料中に導入して形質転換した植物を製造することを含む上記方法。
 26. DNA構築物が、正常PPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードする配列またはそのフラグメントを含む請求項25に記載の方法。
 27. DNA構築物が、PPO遺伝子またはそのフラグメントを含み、触媒開裂部位を超えている請求項26に記載の方法。
 28. 植物試料を、グレープバイン、ジャガイモ、リンゴおよび豆から選択された植物から得る請求項25に記載の方法。
 29. DNA構築物が、
 DNA配列を導入された二成分ベクター；および
 果実または野菜の皮すなわち外皮に特異的であるプロモーターを含む請求項25に記載の方法。
 30. 植物組織中のPPO活性の水準を増大させる方法であって、PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子またはそのフラグメントを含むDNA構築物；および
 植物試料を提供し；そして
 該DNA構築物を該植物試料中に導入して形質転換した植物を製造することを含む上記方法。

31. DNA構築物が、トランシットペプチドをコードするPPOブレ配列をコードしているDNA配列またはそのフラグメントを含む請求項30に記載の方法。

32. PPOブレ配列が、PPOタンパク質を他の細胞区分に向けてるように他の標的配列と置き換えられている請求項31に記載の方法。

33. 植物試料を、タバコ、ソラマメ、トマト、茶、コーヒーおよびココアから選択された植物から得る請求項30に記載の方法。

34. DNA構築物が、DNA配列を導入された二成分ベクター；および果実または野菜の皮すなわち外皮に特異的であるプロモーターを含む請求項30に記載の方法。

35. PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを含むDNAプローブ。

36. PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

cDNAまたはゲノムライブラリー；および

PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含むDNAプローブを提供し；そして該プローブを該ゲノムライブラリーとハイブリッド形成させて、該DNA配列を有するクローンを識別することを含む上記方法。

37. DNAプローブが、異種間に高度に保存されるリンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子のフラグメントを含むDNA配列を含む請求項36に記載の方法。

38. DNAプローブを、

植物種からの全cDNA；および

PPO遺伝子と特異的にハイブリッド形成し且つ異種間に高度に保存されるリンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子の配列を含む2種類またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを提供し；そして

PCRを実施して、PPO遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを

増幅させることを含む方法によって製造する請求項37に記載の方法。

39. オリゴヌクレオチドプライマーが、PPOタンパク質上の糖結合性部位に対応するDNA配列を含む請求項38に記載の方法。

40. PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

植物から単離されたmRNA；

ポリ-dTアダプタープライマー；および

2種類またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを提供し；

該mRNAを逆転写酵素およびアダプタープライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し；そして

そのように生成されたcDNAを、オリゴヌクレオチドプライマーおよびポリメラーゼ連鎖反応を用いて増幅させることを含む上記方法。

41. PPO遺伝子またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

発現ライブラリー；および

精製PPOタンパク質に対して生じた多クローン性抗体を提供し；そして

該多クローン性抗体と該発現ライブラリーとを反応させて、PPO遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを有するクローンを識別することを含む上記方法。

42. N末端アミノ酸配列

APIQAPDISKCGTATVPDGVTP

を有する、実質的に純粋な状態のPPOタンパク質。

明 細 書

ポリフェノールオキシゲナーゼ遺伝子

本発明は、果実および野菜のポリフェノールオキシゲナーゼ(PPO)活性を度更する方法並びにそこで使用するためのDNA配列に関する。

植物組織の褐変は、しばしば、引続きの損傷または損害を引き起こし、概して、これは果実および野菜を腐敗させる結果となる。望ましくない褐変は、植物材料を加工して食品または他の製品を製造する際にも生じる。これらの褐変反応を防止する処置は輸送、貯蔵および加工中に隣り合える。しばしば、これは二酸化硫黄などの化学物質の使用を必要とするが、これらの物質の使用は、それらの安全性および消費者の許容の懸念ゆえに将来において制限されると考えられる。例えば、米国食品医薬品局は、1986年に、大部分の生鮮果実および野菜に対する亜硫酸塩の使用を禁止した。褐変に対する感受性が本質的に低い果実および野菜変種の生産は、これらの化学物質処理の必要をなくするであろう。

したがって、本発明の目的は、先行技術に関連した1種類またはそれ以上の問題を克服するまたは少なくとも軽減することである。

植物の褐変が主として酵素PPOによって触媒されていることは理解される。PPOは植物細胞の色素体中に局在しているが、酵素のフェノール性基質は植物細胞液中に貯蔵されている。この分画は、植物細胞が損傷され、そして酵素およびその基質が混合されない限り、褐変反応を生じさせない。この酵素の量を減少させることができるならば、褐変に対する組織の感受性は減少するであろう。

PPO配列情報を用いて、正常なPPO遺伝子の発現を減少させるように植物を形質転換することができる合成遺伝子を構築し、それによって酵素の合成を減少させることができる。

更に、ある場合において、例えば、紅茶、ココア、コーヒー、黒胡椒、ブラックオリーブ等の生産においては、植物の褐変反応が望ましいことが理解される。これらの場合、PPOの量を増大させて、望ましい程度の褐変または風味成分の変化を生じさせることが望ましいことがある。

正常な植物の成長および発育におけるPPOの役割は、現在のところ理解されていない。この酵素の増大した濃度が植物病原体に対する増大した耐性と相関している場合が多数存在している。当然の結果として、PPO活性の水準を増大させる植物の遺伝子操作は、病原体および有害生物に対する有用な耐性を与えることができる。

グレープバイン(grapevine)のPPO遺伝子は、成熟タンパク質のN末端の上流の追加の103アミノ酸をコードする。この領域は、葉緑体トランシットペプチドの性質を有し、しかもタンパク質が葉緑体中に引き入れられ且つ成熟PPOタンパク質を生産するように処理されるように目的を絞るものであると考えられる。この遺伝子による植物の形質転換は、したがって、他種においてグレープバインPPOの正しい標的および成熟を生じ且つこれらの組織の色素体中で活性グレープバインPPO酵素の蓄積を引き起こすことができる。

本明細書中で用いられる「PPOをコードしている遺伝子」、「PPOをコードする遺伝子」または「PPO遺伝子」は、PPO遺伝子またはそれと実質的に相同の配列を意味すると理解されるべきである。

本発明の第一の態様において、ポリフェノールオキシゲナーゼ(PPO)活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを提供する。

DND配列は、トランシットペプチドをコードするPPO遺伝子のブレ配列を含んでいてよい。

DND配列は修飾されていてもよい。DNA配列は、正常なPPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードする配列またはそのフラグメントを含んでいてよい。

DNA配列は、触媒部位を更に含んでいてよい。

或いは、ブレ配列は、PPOタンパク質を他の細胞区分に向けてるように他の標的配列によって置き換えることができる。

DNA配列は、図1に図示したような、推定上の葉緑体トランシット配列および成熟グレープバインPPOタンパク質を含んでいてよい。

DNA配列は、図2に図示したような、ソラマメの葉のPPO活性を有するポ

リペプチドをコードする遺伝子を含んでいてよい。

DNA配列は、図3に示したような、リンゴ果実PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含んでいてよい。

DNA配列は、図4に示したような、ジャガイモ塊茎PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含んでいてよい。

本発明のもう一つの態様において、PPOをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含む組換えDNAプラスミドを製造する方法であって、

PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメント；および

プラスミド発現ベクターを提供し；そして

該DNA配列および該プラスミド発現ベクターを反応させて、該DNA配列を該プラスミド発現ベクター中に配置することを含む上記方法を提供する。

PPOをコードするDNA配列は、例えば、植物試料から単離されたポリアダニル化RNAから生成することができる。植物は、リンゴ、ジャガイモ、ブドウおよび豆から選択することができる。好ましくは、植物試料は、スルタナブドウ果実、ソラマメの葉、リンゴの外皮若しくは皮層またはジャガイモ塊茎から単離される。

PPOをコードするDNA配列を提供するために、本発明の好ましい態様において、組換えDNAプラスミドの製造方法は、

PPOポリペプチド源を提供し；

PPOをコードするポリアダニル化RNAをそこから単離し；そしてコピーDNA (cDNA) を構築するように該ポリアダニル化RNAを処理する予備工程を含むことができる。

ポリアダニル化RNAの単離は、オリゴ-dTスパンカラムを用いて実施することができる。

本発明のこの態様にしたがってcDNAを構築するようにポリアダニル化RNAを処理する工程は、

該ポリアダニル化RNAを逆転写酵素およびアダプタープライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し；そして

そのように生成されたcDNAを、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて増幅させることを含むことができる。

ポリアダニル化RNAと逆転写酵素との反応工程は、配列

5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT

を有するオリゴヌクレオチドアダプタープライマーを用いることができる。

cDNAを増幅させる工程は、配列

5'-GACTCGAGTCGACATCG

を有するアダプタープライマーおよび5'末端プライマーを用いることができる。

5'末端プライマーは、ブドウcDNAの増幅用に用いられる場合、配列

5'-CCATTCAGGCCICIGATATTCIAAGTGTGG

を有することができる。

5'末端プライマーは、豆cDNAの増幅用に用いられる場合、配列

5'-GCGGATCTT[CT]TA[CT]GA[CT]GA[GA]AA[CT]AA

を有することができる。

5'末端プライマーは、リンゴcDNAの増幅用に用いられる場合、配列

(5'-GCGAATTGGA[AG]GA[TC]ATGGGIAA[TC]TT[TC]TA)

を有することができる。

5'末端プライマーは、ジャガイモcDNAの増幅用に用いられる場合、配列

GEN3:(5'-GCGAATTCTT[TC][TC]TTCCTTT[TC]CA[TC][AC]G)

GEN7:(5'-GCGAATTCAA[TC]GTGA[TC][AC]GATGTGG)

を有することができる。

或いは、本発明のこの態様にしたがってcDNAを構築するようにポリアダニル化RNAを処理する工程は、

該ポリアダニル化RNAを逆転写酵素およびPPO特異的プライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し；

そのように生成されたcDNAをターミナルdトランスフェラーゼで処理して、ポリアダニル化RNAを該cDNAの3'末端に結合し；そして

そのように生成されたポリアダニル化cDNAをPCRによって増幅させることを含むことができる。

ポリアダニル化RNAを逆転写酵素で処理する工程は、ブドウPPOに関して配列

5'-AATCTTTTGGTGACTGGCG

を有するPPO特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いることができる。または該PPO特異的プライマーはジャガイモ塊茎PPOに関して配列

5'-GACGTCATAGTCTTAAAT

を有するオリゴヌクレオチドプライマーである。

cDNAを増幅させる工程は、配列

5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT

を有するオリゴヌクレオチドアダプタープライマーおよびブドウPPOに関して配列

5'-ACCATCAGGCAAGGTGGCGG

またはジャガイモ塊茎PPOに関して配列

5'-TGCTCATCACTGGAGTTGAG

を有するPPO特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いることができる。

二本鎖cDNAのクローニングのためのプラスミド発現ベクターは任意の適当な種類であってよい。プラスミドベクターブループリット

(Blue script) SK⁺は適当であることが分かっている。

クローニング工程は任意の適当な形式をとってよい。好ましい形式は

cDNAをクレンジングフラグメントでプラント末端付きにし；

そのように生成されたcDNAをアガロースゲル上で分別し；

予想の寸法のフラグメントをゲルから単離し；そして

該フラグメントをブループリットSK⁺ベクターのHindIIIまたはEcoRI部位に連結することを含むことができる。

このように生成されたクローンを試験するために、適当な微生物をプラスミド発現ベクターによって形質転換することができ、該微生物を培養し、そしてそこにおいてコードされたポリペプチドを発現させることができる。微生物大腸菌(Escherichia coli) DH5は適当であることが分かっている。

本発明のもう一つの態様において、PPO活性を有するポリペプチドをコード

するDNA配列またはそのフラグメントを含む組換えDNAプラスミドであって、単細胞生物において複製され、転写され、そして翻訳されることができる上記プラスミドを提供する。

プラスミド発現ベクターは任意の適当な種類であってよい。組換えプラスミドは、PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列の上流の構成的プロモーター要素を含むことができる。

本発明のもう一つの態様において、植物組織中のPPO活性の水準を低下させる方法であって、

修飾PPO遺伝子またはそのフラグメントを含むDNA構築物；および植物試料を提供し；そして

該DNA構築物を該植物試料中に導入して形質転換した植物を製造することを含む上記方法を提供する。

DNA構築物は、正常PPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードしている配列またはそのフラグメントを含むことができる。DNA構築物は、PPO遺伝子またはそのフラグメントを含み、触媒開裂部位を組込んでいることができる。

植物は任意の適当な種類であってよい。好ましい態様において、植物は、グレープバイン、ジャガイモ、リンゴおよび豆を含む群より選択することができる。

本発明のもう一つの態様において、植物組織中のPPO活性の水準を増大させる方法であって、

PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子またはそのフラグメントを含むDNA構築物；および

植物試料を提供し；そして

該DNA構築物を該植物試料中に導入して形質転換した植物を製造することを含む上記方法を提供する。

DNA構築物は、PPOアレ配列をコードしているDNA配列またはそのフラグメントを含むことができる。

植物は任意の適当な種類であってよい。好ましい態様において、植物は、タバコ、ソラマメ、トマト、茶、コーヒーおよびココアから成る群より選択すること

ができる。

トランシットペプチドをコードするPPO配列は、PPOタンパク質を他の細胞区分に向けて、他の標的配列と置き換えることができる。異種遺伝子を植物細胞の細胞、ミトコンドリアまたは細胞内空間に向けての配列は既に知られている。更に、グレーブバインPPOに関するトランシット配列を用いて他のタンパク質を色素体に集中させることができる。

DNA構築物は、導入された遺伝子を植物中の至る所で発現させると考えられる構成的プロモーターを含むことができる。

多数の植物組織において、PPOがある組織種中で高度に発現されることは理解される。例えば、PPO活性はブドウ果実の皮において果肉の場合よりもはるかに高く、そしてジャガイモ塊茎の外皮は皮層よりも高い活性を有する。

PPO活性の水準を植物のある組織中においてのみまたは植物のある発育段階でのみ変更することは望ましいことがあるが、これは特異的プロモーター要素を用いることによって達成することができる。例えば、パタリン (patatin) プロモーターの使用は、ジャガイモ植物の塊茎組織中においてのみPPO濃度を変更する。これは塊茎におけるPPO活性を低下させ且つ腐敗を減少させるが、ジャガイモ植物の他の部分におけるPPO活性は変化しない。

したがって、DNA構築物は、果実および野菜の外皮すなわち皮に対して特異的であるプロモーターを含んで、異種タンパク質を外部組織種に特異的に集中させることができる。

これは、外皮すなわち皮の性質、例えば、色、風味、病原体に対する耐性等を、消費される果実または野菜の内部とは無関係に操作することを可能にする。

好ましい態様において、DNA構築物は、PPOをコードしているDNA配列またはそのフラグメントを導入された二成分ベクターを含むことができる。

もう一つの好ましい態様において、DNA構築物の植物中への導入は、DNA構築物を有するアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) による植物の感染によることができる。

本発明のもう一つの態様において、形質転換した植物であって、正常なPPO遺伝子の発現を変更する合成遺伝子を含む上記植物を提供する。

PPO遺伝子と特異的にハイブリッド形成し且つ異種間高度に保存されるリンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子の配列を含む2種類またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを提供し；そして

PCRを行なって、PPO遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを増幅させることを含む方法によって製造することができる。

オリゴヌクレオチドプライマーは、PPOタンパク質上の結合部位に対応するDNA配列を含むことができる。

本発明のもう一つの態様において、PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

植物種から単離されたmRNA；

ポリ-dTアダプタープライマー；および

2種類またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを提供し；

mRNAを逆転写酵素およびアダプタープライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し；そして

そのように生成されたcDNAを、オリゴヌクレオチドプライマーおよびポリメラーゼ連鎖反応を用いて増幅させることを含む上記方法を提供する。

好ましい態様において、オリゴヌクレオチドプライマーは、リンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子配列に基づくことができる。

本発明のもう一つの態様において、PPOタンパク質の精製法であって、植物試料；

デタージェント；および

1種類またはそれ以上のクロマトグラフィーカラムを提供し；

該植物試料を該デタージェントで抽出し；

そのように生成された抽出物を硫酸アンモニウムで処理し；そして

そのように生成された抽出物を、それをクロマトグラフィーカラムに通すことによって分別することを含む上記方法を提供する。

植物試料は任意の適当な種類であってよい。植物試料はグレーブバイン果実であってよい。この組織は高濃度のPPOを含み、成熟ブドウ果実の果汁中の大部

分は任意の適当な種類であってよい。好ましい態様において、植物は、グレーブバイン、ジャガイモ、リンゴ、タバコ、豆、モモ、ナシおよびアズキから成る群より選択することができる。

本発明のもう一つの態様において、PPOをコードしている配列またはそのフラグメントを含む植物用ワクチンを提供する。

本発明のもう一つの態様において、PPOをコードしているDNA配列またはそのフラグメントを含むDNAプローブを提供する。

プローブは、任意の適当な方式で標識することができる。放射性標識または非放射性標識を用いることができる。便宜上、プローブは、適当なプラスミドベクター中のクローニングされたインサートの形で提供することができる。

グレーブバインPPO配列を用いて、この遺伝子を他の種から得るようにPCRで用いるための一般的な目的オリゴヌクレオチドプライマーを設計することができる。植物PPOタンパク質は糖分子族として結合することが知られており、そしてヘモシアニンおよびチロシナーゼタンパク質からの配列に対して相関を示し、これらのタンパク質上の結合部位に対応するブドウタンパク質配列の二つの領域が識別された。これらの領域は種々の生物間で明らかに保存されるので、それらは、他の植物PPO遺伝子を得るためにプローブおよびプライマーを設計するのに適している。

したがって、本発明の更にもう一つの態様において、PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

cDNAまたはゲノムライブラリー；および

ポリフェノールオキシダーゼ (PPO) 活性を有するポリペプチドの遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを含むDNAプローブを提供し；そして該プローブをゲノムライブラリーとハイブリッド形成させて、該DNA配列を有するクローンを識別することを含む上記方法を提供する。

DNAプローブは、異種間高度に保存されるリンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子のフラグメントを含むDNA配列を含むことができる。

DNAプローブは、植物種からの全cDNA；および

分のPPO活性は固形物によるものであり、遠心分離によって果汁から分離した後にデタージェントによって可溶化することができる。植物試料は豆の葉であってよい。

デタージェントは陽イオン性であってよい。異化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (CTAB) デタージェントは適当であることが分かっている。

クロマトグラフィーカラムはセファロース基材であってよい。3種類のクロマトグラフィーカラムを用いることができる。Qセファロースに続いてフェニルセファロース、次にヒドロキシルアパタイトが適当であることが分かっている。本発明のもう一つの態様において、N末端アミノ酸配列

APIQAPDISKCGTATVPDGVTP

を有する実質的に純粋な状態のPPOタンパク質を提供する。

ここで、本発明を実施例および図面に関して更に充分に記載する。しかしながら、以下の説明が単に例示するためのものであることは理解されるべきであり、いかなる場合にも上記の本発明の一般性を制限するものとしてとるべきではない。図面において、

図1：

推定上の集積体トランシット配列および成熟グレーブバインPPOタンパク質双方をコードする複合完全長GPO1 cDNAヌクレオチド配列および誘導タンパク質配列。

翻訳開始部位をボールド体で示し、成熟タンパク質のN末端に黒印を付ける。破線はN末端プライマーの位置を示し、そして2本の矢線は、トランシットペプチド配列をクローニングするための2種類のアンチセンスプライマーを構築するのに用いられた領域を示す。

図2：

ソラマメの葉のポリフェノールオキシダーゼのBPO1クローンの核酸および誘導タンパク質配列。実線は、ポリメラーゼ連鎖反応によってcDNAを増幅させるのに用いたB15プライマーの領域を示す。

図3：

リンゴ果実PPOをコードするクローニングpSR7およびpSR8の核酸および

誘導タンパク質配列。実際は、ポリメラーゼ連鎖反応によってcDNAを増幅させるのに用いたGEN4プライマーの領域を示す。

図4:

ジャガイモ塊茎PPOをコードするクローンの検出および誘導タンパク質配列。実際は、ポリメラーゼ連鎖反応によってcDNAを増幅させるのに用いたGEN3プライマーの領域を示す。

実施例1

PPOタンパク質の精製

PPOをグレープバイン果実から精製した。最初の実験により、この組織が高濃度の酵素を含んでいることおよびドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド (SDS-PAGE) ゲルでの電気泳動によって確認されたように酵素が1種類だけの状態で存在しているらしいことが分かった。成熟ブドウ果実の果汁において、大部分のPPO活性は固形物によるものであって、遠心分離によって果汁から分離した後にデタージェントで可溶化することができた。精製中の酵素活性は、基質である4-メチルカルホルの存在下で消費された酸素として測定された。精製中の全工程を4℃で実施した。

スルタナブドウ30キログラムを小規模のワインプレスで圧搾し、そして100mMアスコルビン酸塩に10mMジチオトレイトールを加えた溶液100mlを、ブドウ果汁各900mlに加えた。果汁を10,000xgで10分間遠心分離し、そして上澄みを捨てた。ペレット部分を、10mMアスコルビン酸塩および1mMジチオトレイトールを加えた25mMリン酸ナトリウム、pH7.2中に最終容量1.75リットルまで再懸濁させた後、陽イオンデタージェントである異化ドデシルトリメチルアンモニウム (CTAB) の4% (w/v) 溶液250mlを加えた。20分間インキュベートした後、抽出物を15,000xgで15分間遠心分離した。上澄みを固体硫酸アンモニウムで45%まで飽和させ、pHを7.0に調整した後、それを15,000xgで15分間遠心分離した。この上澄みを固体硫酸アンモニウムで95%まで飽和させ、pHを7.0に調整した後、それを15,000xgで30分間遠心分離した。ペレットを、10mMアスコルビン酸塩および2mMジチオトレイトールを加えた20mMピスト

ブドウ果実PPOの精製

| 工程 | タンパク質 (mg) | 活性 (U) | 比活性 (U/mg) | 回収率 (%) | 精製 (一倍) |
|-------------|---------------|-----------|---------------|------------|------------|
| 果汁* | 19,350 | 7,040 | 0.4 | 100 | 1 |
| CTAB抽出物 | 960 | 2,070 | 2.2 | 29 | 6 |
| 硫酸アンモニウム | 600 | 1,760 | 2.9 | 25 | 8 |
| Q-セファロース | 130 | 1,520 | 11.8 | 22 | 33 |
| フェニルセファロース | 10.8 | 400 | 37 | 5 | 103 |
| ヒドロキシルアパタイト | 3.5 | 230 | 65 | 3 | 180 |

*ブドウ30kgから

精製純度は、SDS-PAGEを要することによって検査した。見掛けの分子量が40kDaのタンパク質の単純散バンドは最終精製品において示された。

実施例2

アミノ酸配列決定

精製PPOタンパク質約1mgを、20mM塩酸アンモニウム、pH7.6で平衡させたセファデックスG25の2.5x20cmカラムにおいて流速5ml/分で脱塩した。タンパク質ピークを集め且つ真空下で乾燥させた。乾燥タンパク質をカルボキシメチル化し、そしてN末端アミノ酸配列を、自動アミノ酸シーケンサーを用いてエドマン分解によって決定した。下記の配列

APIQAPDISKCGTATVPDGVTP

を得た。

実施例3

ブドウPPO遺伝子のクローニング

リザン (Rezan) およびクラーク (Kraek) (1) の方法にしたがって、全RNAをスルタナブドウ果実から単離した。全RNAを1種類のオリゴdTスパンカラム (ファーマシア・エルケイビー・バイオテクノロジー (Pharmacia LKB Biotechnology)) に通すことによってポリ (A)⁺に富むRNA画分を得た。

特表平7-501686 (6)

リソプロパン、pH7.5 (バッファーA) 中に最終容量100mlで再懸濁させた。抽出物を、バッファーAで平衡させたセファデックスG25の4x40cmカラムにおいて流速10ml/分で脱塩し、そして活性画分を集めた。

抽出物を、バッファーAで平衡させたQ-セファロース・ファスト・フローの2.5x10cmカラムに流速6ml/分で入れた後、カラムをバッファーA400mlで洗浄した。PPOをバッファーA中の0~500mM NaClの勾配で溶離し、そして活性画分を集めた。硫酸アンモニウムを最終濃度1Mまで加え、pHを7.0に調整した。この画分を、1M硫酸アンモニウム、1M KClおよび1mMジチオトレイトールを加えた50mMリン酸ナトリウム、pH7.0 (バッファーB) で平衡させたフェニルセファロース・ファスト・フローの1x35cmカラムに流速1.5ml/分で充填した。カラムをバッファーB120mlで洗浄した後、PPOを100~0%バッファーBの勾配で溶離した。活性画分を集め且つアミコン (Amicon) PM10限外濾過膜上で濃縮した後、1mMジチオトレイトールを加えた20mMリン酸ナトリウム、pH7.0 (バッファーC) を3回取り換えるのに対して同一膜でダイアフィルトレーションを行った。この画分を、バッファーCで平衡させたヒドロキシルアパタイトの1x30cmカラムに流速1ml/分で入れた。カラムをバッファーC50mlで洗浄した後、PPOをバッファーC中0~500mMリン酸ナトリウムの勾配で溶離した。集めた活性画分をグリセロール中で20% (v/v) にし且つ-80℃で凍凍した。

この操作の結果、180倍に精製したPPOが得られ且つ精製PPOタンパク質3.5mgを生成した。精製を以下に要約する。

第一鎖cDNAを、50mMトリス-HCl pH8.3、25mM KCl、10mM MgCl₂、4mM DTT、1mM NaPPi、1mM dNTPs、リボヌクレアーゼ阻害剤1U、ブドウ果実のポリ (A)⁺に富むRNA1.4μg、AMV逆転写酵素 (プロメガ・コープ (Promega Corp)) 21UおよびハイブリッドdT17-アダプタープライマー

(5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTITTTTTTTTTT)

0.5μgを含む反応混合物中において42℃で1時間合成した。次に、反応混合物をTE (10mMトリス-HCl pH8.0、1mM EDTA) で80μlまで希釈し且つ-20℃で貯蔵した。

32-マーオリゴヌクレオチドプライマー

(5'-CCATACAGGCGCCGATATTCIAAGTCGG)

を、精製ブドウPPOのN末端タンパク質配列 (アミノ酸2~12) に対して設計した。コドン使用表に基づいて3個以上の塩基を選択することができる位置でイソシンを用いた。これおよび他の記載したオリゴヌクレオチドプライマー全部をアプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) DNA合成機で合成した。

cDNAを、フロマン (Frohman) (2) の方法に本質的にしたがって、10mMトリス-HCl (25℃でpH9.0)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTPs、0.01%ゼラチン (w/v)、0.1%トリトンX-100、希釈した第一鎖cDNA反応混合物5μl、Taq DNAポリメラーゼ (プロメガ・コープ) 1.25U、100nMアダプタープライマー

(5'-GACTCGAGTCGACATCG)

および1μM N末端プライマー (上記に記載の) を含む反応混合物50μl中においてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって増幅させた。増幅は、94℃で1分間の変性、55℃で1分間のアニーリング、72℃まで2分間にわたるスローランプおよび72℃で3分間の伸長を5サイクルの初期プログラムに続いて、94℃1分間、55℃1分間および72℃3分間を25サイクル実施した。増幅されたDNAをフェノール/クロロホルムで抽出し、エタノールで沈殿させ、そ

特表平7-501686 (7)

してTE中に再懸濁させた。DNAをクレノウフラグメントでプラント末端付きにし、そして2%ヌシエーブ(Nusieve) GTGアガロース(FMCバイオロダクツ(Bioproductions))ゲル上で分別した。1700bpフラグメントをゲルから単離し且つブルースクリプトSK⁺ベクター(ストラタジーン・クローニング・システムズ(Stratagene Cloning Systems))のHincII部位に連結させた。連結したDNAを大腸菌DH5中に導入した。陽性クローン(GPOと称する)を単離し且つジデオキシ配列決定法(3)によって配列決定した。

これは、N末端プライマーの存在を確認し、そして該プライマーの下流の誘導タンパク質配列と、上記の精製ブドウPPO酵素に関して得られたN末端タンパク質配列との比較により、このクローンをブドウPPOをコードすることが確認された。

実施例4

トランシクトベクトル配列のクローニング

上記の1700bpクローンをプローブされたブドウmRNAのノーザンブロットにより、該クローンとハイブリッド形成した2200bpの転写物が識別された。これは、そのクローンが成熟PPO配列のN末端をコードしていたとしても、クローンの5'プライム末端の上流に更に別の配列が存在したことを示唆した。GPO1 mRNAの5'末端を有するcDNAクローン(推定上のトランシクトベクトルをコードする)を、本質的には(2)に記載の通りであるが嵌め込まれたアンチセンスプライマーを用いてブドウ果実RNAから増幅させた。第一鎖cDNAを、上記に記載の通りであるがハイブリッドdT17-アダプタープライマーの代わりに、N末端プライマー領域の下流の44塩基領域(すなわち、416~435nt; 図1)に相補的なGPO1特異的プライマー1

(5'-AATCTTGTGGTACTGGG)

を置き換えて、ブドウ果実のポリ(A)⁺に富むRNAから合成した。反応混合物を0.1xTEで2mlまで希釈し且つセントリコン(Centricon)30スピンフィルター(アミン・コープ)によって4000gで20分間遠心分離して過剰のプライマーを除去した。この工程を繰返し、そして残留する液体

を、スピードVac遠心分離を用いて20μlまで濃縮した。ポリ(dA)尾部配列は、37℃で5分間に続いて65℃で5分間インキュベートした後にTEで500μlまで希釈されたcDNA11.5μl、5xテラーリングバッファー(プロメガ・コープ)4μl、ATP(1mM)4μlおよびターミナルdトランスフェラーゼ(プロメガ・コープ)10Uを含む反応混合物20μl中のターミナルdトランスフェラーゼによってcDNA鎖の3'末端に結合された。ポリ(dA)末端付きcDNAのPCR増幅は、10mMトリス-HCl(25℃でpH9.0)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTPs、0.01%ゼラチン(w/v)、0.1%トリトンX-100、希釈した第一鎖cDNA反応混合物5μl、Taq DNAポリメラーゼ(プロメガ・コープ)1.25U、200nMハイブリッドdT17-アダプタープライマーおよび、N末端プライマー結合性領域のすぐ下流の領域(374~393nt; 図1)に相補的な900nM GPO1特異的プライマー2

(5'-ACCATCAGGACGGTGGCG)

を含む反応混合物中において実施した。増幅は、94℃1分間、55℃1分間および72℃3分間を25サイクル実施した。得られた430bpフラグメントをブルースクリプトSK⁺ベクターでクローニングし、前記のように配列決定し、そしてGPO1クローンと置換する配列の予想領域を含むことが分り、このcDNAクローンをGPO1 mRNAの5'末端を含むことが確認された。

実施例5

豆の葉のPPO遺伝子のクローニング

リザンおよびクラーク(1)の方法にしたがって、全RNAをソラマメの葉から単離した。全RNAを1種類のオリゴdTスパンカラム(ファーマシア・LKB・バイオテクノロジー)に通すことによってポリ(A)⁺に富むRNA画分を得た。

第一鎖cDNAを、50mMトリス-HCl pH8.3、25mM KCl、10mM MgCl₂、4mM DTT、1mM NaPPi、1mM dNTPs、リボヌクレアーゼ阻害剤1U、ソラマメのポリ(A)⁺に富むRNA3.1μg、AMV逆転写酵素(プロメガ・コープ)21UおよびハイブリッドdT

実施例6

リンゴPPO遺伝子のクローニング

リザンおよびクラーク(1)の方法にしたがって、全RNAを成熟リンゴ果実から単離した。ポリ(A)⁺に富むRNA画分は、ポリAトラクトmRNAキット(プロメガ・コーポレーション)を用いて得られた。

第一鎖cDNAを、50mMトリス-HCl pH8.3、25mM KCl、10mM MgCl₂、4mM DTT、1mM NaPPi、1mM dNTPs、リボヌクレアーゼ阻害剤40U、リンゴのポリ(A)⁺に富むRNA1μg、AMV逆転写酵素(プロメガ・コープ)24UおよびハイブリッドdT17-アダプタープライマー

(5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTT)

0.54μgを含む反応混合物25μl中において42℃で1時間合成した。次に、反応混合物をTE(10mMトリス-HCl pH8.0、1mM EDTA)で525μlまで希釈し且つ-20℃で貯蔵した。

28マーオリゴヌクレオチドプライマー(GEN4)

(5'-GGGAATTCGA[AG]GA[TC]ATGGGIAA[TC]TT[TC]TA)

を、ブドウPPOの配列に基づいて設計した。

cDNAを、本質的にはフローマン(2)の方法にしたがって、10mMトリス-HCl(25℃でpH9.0)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTPs、0.01%ゼラチン(w/v)、0.1%トリトンX-100、希釈した第一鎖cDNA反応混合物20μl、Taq DNAポリメラーゼ(プロメガ・コープ)2.5U、100nMアダプタープライマー

(5'-GACTCGAGTCGACATCG)

および1μM GEN4プライマー(上記に記載の)を含む反応混合物100μl中においてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅させた。

増幅は、94℃で1分間の変性、37℃で2分間のアニーリング、72℃まで2分間にわたるスローランブおよび72℃で3分間の伸長を3サイクルの初期プログラムに続いて、94℃1分間、55℃1分間および72℃3分間を25サイ

17-アダプタープライマー

(5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTT)

0.81μgを含む反応混合物中において42℃で1時間合成した。次に、反応混合物をTE(10mMトリス-HCl pH8.0、1mM EDTA)で840μlまで希釈し且つ-20℃で貯蔵した。

25マーオリゴヌクレオチドプライマー(B15)

(5'-GGGATCTCTT[CT]TA[CT]GA[CT]GA[GA]AA[CT]AA)

を、ブドウPPOの配列に基づいて設計した。

cDNAを、本質的にはフローマン(2)の方法にしたがって、10mMトリス-HCl(25℃でpH9.0)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTPs、0.01%ゼラチン(w/v)、0.1%トリトンX-100、希釈した第一鎖cDNA反応混合物20μl、Taq DNAポリメラーゼ(プロメガ・コープ)2.5U、100nMアダプタープライマー

(5'-GACTCGAGTCGACATCG)

および1μM B15プライマー(上記に記載の)を含む反応混合物100μl中においてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅させた。

増幅は、94℃で1分間の変性、37℃で2分間のアニーリング、72℃まで2分間にわたるスローランブおよび72℃で3分間の伸長を3サイクルの初期プログラムに続いて、94℃1分間、55℃1分間および72℃3分間を25サイクル実施した。増幅されたDNAをフェノール/クロロホルムで抽出し、エタノールで沈殿させ、そしてTE中に再懸濁させた。DNAをクレノウフラグメントでプラント末端付きにし、そして2%ヌシエーブGTGアガロース(FMCバイオロダクツ)ゲル上で分別した。700bpフラグメントをゲルから単離し且つブルースクリプトSK⁺ベクター(ストラタジーン・クローニング・システムズ)のEcoRV部位に連結させた。連結したDNAを大腸菌DH5中に導入した。組換え体クローンを、ブドウPPOクローン(GPO1)の放射性標識フラグメントを用いてスクリーンし、そして陽性クローン(BPO1と称する)を単離し且つジデオキシ配列決定法(3)によって配列決定した。

クル実施した。増幅されたDNAをフェノール/クロロホルムで抽出し、エタノールで沈殿させ、そしてTE中に再懸濁させた。DNAをクレンジングフラグメントでプラント末端付し、そして2%ヌシープGTGアガロース (FMCバイオロダクツ) ゲル上で分別した。1050bpのフラグメントをゲルから単離し且つブルースクリプトSK⁺ベクター (ストラタジーン・クロニング・システムズ) のEcoRV部位に連結させた。連結したDNAを大腸菌DH5中に導入した。組換え体クローンを、ブドウPPOクローン (GPO1) の放射性標識フラグメントを用いてスクリーンし、そして2種類の陽性クローン (pSR7およびpSR8と称する) を単離し且つジデオキシ配列決定法 (3) によって配列決定した。

実施例7

ジャガイモPPO遺伝子のクローニング

ロージマン (Logemann) ら (4) の方法にしたがって、全RNAを未熟ジャガイモ塊茎から単離した。ポリ (A)⁺に富むRNA画分は、ポリATラクトmRNAキット (プロメガ・コーポレーション) を用いて得られた。

第一鎖cDNAを、50mMトリス-HCl pH8.3、25mM KCl、10mM MgCl₂、4mM DTT、1mM NaPPi、1mM dNTPs、リボヌクレアーゼ阻害剤40U、ジャガイモのポリ (A)⁺に富むRNA 1.8μg、AMV逆転写酵素 (プロメガ・コープ) 24UおよびハイブリッドdT17-アダプタープライマー

(5'-GACTCGAGTCGACATGATTTTITTTTTTTTTT)

0.54μgを含む反応混合物25μl中において42℃で1時間合成した。次に、反応混合物をTE (10mMトリス-HCl pH8.0、1mM EDTA) で525μlまで希釈し且つ-20℃で貯蔵した。

2種類のオリゴヌクレオチドプライマーを、ブドウおよびリンゴのPPOの配列中の領域から設計した。

GEN3: (5'-GGGAATTCCTTTC) (TC)TTCCTTTC)CA(TC) (AC)G)

GEN7: (5'-GCGAATTCGA(TC)GTGCA(TC) (AC)GATGTCG)

cDNAを、本質的にはフロマン (2) の方法にしたがって、10mMトリス

-HCl (25℃でpH9.0)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTPs、0.01%ゼラチン (w/v)、0.1%トリトンX-100、希釈した第一鎖cDNA反応混合物20μl、Taq DNAポリメラーゼ (プロメガ・コープ) 2.5U、100nMアダプタープライマー

(5'-GACTCGAGTCGACATG)

および1μM GENプライマー (上記に記載の) を含む反応混合物100μl中においてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって増幅させた。

増幅は、94℃で1分間の変性、37℃で2分間のアニーリング、72℃まで2分間にわたるスローランブおよび72℃で3分間の伸長を3サイクルの初期プログラムに続いて、94℃1分間、55℃1分間および72℃3分間を25サイクル実施した。増幅されたDNAをフェノール/クロロホルムで抽出し、エタノールで沈殿させ、そしてTE中に再懸濁させた。DNAをクレンジングフラグメントでプラント末端付し、そして2%ヌシープGTGアガロース (FMCバイオロダクツ) ゲル上で分別した。1500bpおよび1000bpのフラグメントをゲルから単離し且つブルースクリプトSK⁺ベクター (ストラタジーン・クロニング・システムズ) のEcoRV部位に連結させた。連結したDNAを大腸菌DH5中に導入した。組換え体クローンを選択し、そして3種類のクローン (pSRP32、pSRP33およびpSRP72と称する) を単離し且つジデオキシ配列決定法 (3) によって配列決定した。

ジャガイモ塊茎PPO mRNAの5'末端を有するcDNAクローンを、本質的には (2) に記載の通りであるが改め込まれたアンチセンスプライマーを用いてジャガイモ塊茎RNAから増幅させた。第一鎖cDNAを、上記に記載の通りであるがハイブリッドdT17-アダプタープライマーの代わりに、pSRP32およびpSRP33の5'末端の下流の257~278塩基領域に相補的なジャガイモ塊茎PPO特異的プライマー1

(5'-GACGTCACATTAGTGTAAAT)

を置き換えて、ジャガイモ塊茎のポリ (A)⁺に富むRNAから合成した。反応混合物を0.1xTEで2mlまで希釈し且つセントリコン80スピニングフィルター (アミコン・コープ) によって4000gで20分間遠心分離して過剰のプラ

イマーを除去した。この工程を繰返し、そして残留する液体を、スピードVac遠心分離を用いて12μlまで濃縮した。ポリ (dA) 尾部配列は、37℃で5分間に続いて65℃で5分間インキュベートした後にTEで500μlまで希釈されたcDNA11.5μl、5xテレーリングバッファー (プロメガ・コープ) 4μl、ATP (1mM) 4μlおよびターミナルdトランスフェラーゼ (プロメガ・コープ) 10Uを含む反応混合物20μl中においてターミナルdトランスフェラーゼによってcDNA鎖の3'末端に結合された。ポリ (dA) 末端付きcDNAのPCR増幅は、10mMトリス-HCl (25℃でpH9.0)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTPs、0.01%ゼラチン (w/v)、0.1%トリトンX-100、希釈した第一鎖cDNA反応混合物5μl、Taq DNAポリメラーゼ (プロメガ・コープ) 1.25U、200nMハイブリッドdT17-アダプタープライマーおよびpSRP32およびpSRP33の5'末端の下流の233~254塩基領域に相補的な900nM ジャガイモ塊茎PPO特異的プライマー2

(5'-TGCTCATCACTGGAGTTCAG)

を含む反応混合物中において実施した。増幅は、94℃1分間、55℃1分間および72℃3分間を25サイクル実施した。得られたフラグメントをブルースクリプトSK⁺ベクターでクローニングし、前記のように配列決定し、そしてpSRP32クローンと重複する配列の予想領域を含むことが分かり、このcDNAクローンはジャガイモ塊茎mRNAの5'末端を含むことが確認された。

参考文献

1. リザイアン (Rezaian), M. A. およびクラーク (Krake), L. R. (1987). グレーブバインの核酸抽出およびその検出 (Nucleic acid extraction and vine detection in grapevine). *J. Vir. Methods* 17: 277~285.
2. フロマン (Frohmann), M. A. (1990). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (M. A. イニス (Innis)、ゲルフランド

(Gelfand), D. H.、スニンスキー (Sninsky), J. J.、ホワイト (White), T. J. 監修、アカデミック・プレス (Academic Press)、ニューヨーク、28~38頁。

3. サンガー (Sanger), F.、ニックレン (Nicklen), S. およびクルソン (Coulson), A. R. (1977). 鎖終結阻害剤によるDNA配列決定 (DNA sequencing with chain-terminating inhibitors). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463~5467.

4. ロージマン (Logemann), J.、シェール (Schell), J. およびウィルミツァー (Willmitzer), L. (1987). 植物組織からRNAを単離する改良法 (Improved method for the isolation of RNA from plant tissues). *Analytical Biochemistry* 163: 16~20.

最後に、本明細書中に記載した本発明の精神から逸脱することなく様々な他の修正および/または変更を行なうことができることは理解されるべきである。

FIGURE 1

10 20 30 40 50 60
ATCACTCATCACTCTCTCTCTAAAGCTATGGCTCTCTTGGCTTGGCTCGCTCACAACCTCC
M A S L P W S L T T S

70 80 90 100 110 120
ACCGCCATCGCAACACCAACCAATTTAGCGCTTCCACGTTCTCCCTCTTCAAGG
T A I A N T T N I S A F P P S P L F Q R

130 140 150 160 170 180
GCTTCTCATGTCCCGGTAGCCAGAAACCGAAGCCGAGATTGTCTCTAGTAAGGTGTCTC
A S H V P V A R N R S R R F A P S K V S

190 200 210 220 230 240
TGCAATTCTCGGAATGGTGATCCCAACTCGGATTCTACTCTCCGACGTTTCGAGAACTTCC
C N S A N G D P N S D S T S D V R E T S

250 260 270 280 290 300
TCAGGGAAGTTAGATAGGAGGAATGTGCTTCTTGGCATAGGAGGCTGTATGGTGTCTGCT
S G K L D R R N V L L G I G G L Y G A A

310 320 330 340 350 360
CGCGCTCTCGCGCCACTAAGCCATTAGCGTTTGGGCTTCCCATCCAGGCACCGATATA
G G L G A T K P L A F G A P I G A P D I

370 380 390 400 410 420
TCCAAGTGTGGTACCGGCACGGTGGCTATGGTGTAAACGCCCAAAATTCGCTCCCGGCA
S K C G F A T V P D G V T P T N C C P I

430 440 450 460 470 480
GTCACCAACAAGATTATAGATTTCAGCTACCTTCTCAGGTTCCCGCATGCGTACCAGG
V T T K I I D F Q L P S S G S P H R T R

1030 1040 1050 1060 1070 1080
CCTGGAGCGGGTACCCCTTGAGGACGCGCCACATAATATAGTCCACAAATGCACTGCTCTT
P G A C T L E H A P H N I V H K W T G L

1090 1100 1110 1120 1130 1140
GCTGATAAGCCTAGTAGGACATGGGAACTCTATACTCGCGGCAGACGCCCATATTC
A D K P S E D M G N F Y T A G R D P I F

1150 1160 1170 1180 1190 1200
TTCGGTCACACGCCCAATGTGGATCGGATGTGGAATATATGGAAGAACTATAGGAGGTAAA
F G H H A N V D R M W N I W K T I G G R

1210 1220 1230 1240 1250 1260
AATAGAAAGGATTCACGGGATACGGATTGGCTTGACGCCACGCTTGCTCTTACGACGAG
N R K D F T D T D W L D A T F V F Y D E

1270 1280 1290 1300 1310 1320
AACAACAACCTTGTAAAGTCAAGGTCTCGGACTGTGTGCAACACTCCAAAGCTGAGATAC
N K Q L V K V K V S D C V D T S K L R Y

1330 1340 1350 1360 1370 1380
CAATATCAGGATATTCTATTCCATGGCTACCAAAAAATACGAAGGCCAAAGCGGAAGG
Q Y Q D I P I F W L P K N T K A K A K T

1390 1400 1410 1420 1430 1440
ACCACCAAAAGTTCCAAGTCCGGAGTAGCGAAAGCGCGCGCAACTCCCAAGACGACGATC
T T K S S K S G V A K A A E L P K T T I

1450 1460 1470 1480 1490 1500
AGCAGCATCGGAGACTTCCCAAAAGCTTTAACTCAGTGATAGAGTAGAAGTTCCAAAGG
S S I G D F P K A L N S V I R V E V P R

1510 1520 1530 1540 1550 1560
CCAAAGAAATCAAGAACCAAGGAGAAAGAGGATGAGGAAGGCTGTACTGATAAA
P K K S R S K K E K E D E E V L L I K

| | | | | | | | |
|--|-----|-----|------|------|------|-----|-----|
| 190 | 300 | 410 | 520 | 630 | 740 | 850 | 960 |
| CCAGCTGCTCACTTGGTCAGCAAAAGAGTACTTACGCAAGTATATAAAAGGCCATTGAGCTG | | | | | | | |
| P A A H L V S K E Y L A K Y K K A I E L | | | | | | | |
| 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 | | |
| CAGAAAGCTCTTCCGTATGATGATCCCGCTAGTTTCAAGCAACAGGCTAATGTCCATTGC | | | | | | | |
| Q K A L L P D D D F R S F K Q Q A N V H C | | | | | | | |
| 610 | 620 | 630 | 640 | 650 | 660 | | |
| ACCTATTGCCAAGGGCTTATGATCAGGTTGGGTATACCGACCTAGTAAGTCTCAGGTTCT | | | | | | | |
| T Y C Q G A Y D Q V G Y T D L E L Q V H | | | | | | | |
| 670 | 680 | 690 | 700 | 710 | 720 | | |
| GCTTCATGCTTTTCCCTCTTCACCGCTACTACTCTCACTTCAATGAGAGAATTCTT | | | | | | | |
| A S W L F L P F H R Y Y L Y F N E R I L | | | | | | | |
| 730 | 740 | 750 | 760 | 770 | 780 | | |
| GCAAAGTTGATGACGAGATCCACCTTCGCTTGGCTTATGGGCTTGGGATAACCTGAT | | | | | | | |
| A K L I D D P T F A L P Y W A W D N P D | | | | | | | |
| 790 | 800 | 810 | 820 | 830 | 840 | | |
| GGCATGTATATGCCGACCATCTATGCTAGTTCGCCCATCATCACTCTACGACGAGAAGGCC | | | | | | | |
| G K Y M P T I Y A S S P S S L Y D E K R | | | | | | | |
| 850 | 860 | 870 | 880 | 890 | 900 | | |
| AACGCCAAGCAGCTGCTCCGACTGTGATCGATCTCGACTACGATGGCACCAGAACCCACA | | | | | | | |
| N A K A H L P P T V I D L D Y D G T E P T | | | | | | | |
| 910 | 920 | 930 | 940 | 950 | 960 | | |
| ATCCCTGATGACGAAGTAAAAACCGCAATCTGGCAATCATGTACAAACAAATTGTGTGC | | | | | | | |
| I P D D E L K T D N L A I M Y K Q I V S | | | | | | | |
| 970 | 980 | 990 | 1000 | 1010 | 1020 | | |
| GGTGCCAGCACTCCTAAGCTTTTCTTGTACCCATACCGCGCGCGGATGCGGATTCG | | | | | | | |
| G A T T P K L F L G Y P Y R A G D A I D | | | | | | | |

```

1590      1580      1590      1600      1610      1620
GGAATAGAGCTAGATAGAGAGAATTTCGTCAAGTTTGATGTGTCATCAACGACGAAGAT
G I E L D R E N F V K F D V Y I N D E D

1630      1640      1650      1660      1670      1680
TATTCACTGACTAGGCCTTAAGAATAGTGAGITTCGAGGAAGCTTTGTGAACGTACCAC
Y S V S R P K N S E F A G S F V N V P H

1690      1700      1710      1720      1730      1740
AAGCATATGAAGAAATCAAGACGAAGACCAATCTGAGGTTTCGGATAAATGAGCTGTTA
K H M K E M K T K T N L R F A I N E L L

1750      1760      1770      1780      1790      1800
GAGGACTTCGGACCGAAGATGATGAGAGTGTGATCGTGACTATAGTCCCTCGTCTGGG
E D L G A E D D E S V I V T I V P R A G

1810      1820      1830      1840      1850      1860
GGCGATGATGCACCAATTGGTGGAAITGAGATCGAGTTTGTTCGATTGATCCCATCTT
G D D V T I G G I E I E F V S D -

1870      1880      1890      1900      1910      1920
TCAATGATTATCCATTATATGTATGTATCAGGTAAGTCACATCTTTATGTGATTATGGG

1930      1940      1950      1960      1970      1980
AAATGTGAGACTTCTCTATCTTCCCGCTCAAGCTCTTTTATTAATTAGAGCGGTTCGTTA

1990
AAAAAAAAA

```

FIGURE 2

10 20 30 40 50 60
 TTTTACGATGAGAACAAAGTCTTGTAGGGTAAATGTGAAGGACAGCTCTTGACACAGAA
 F Y D E N K N L V R V N V K D S L D T E

70 80 90 100 110 120
 AAAGTAGGTTATGCTTATCAAAATGTTCCCATCCATGGGAAATGCTAAACCTGTGCCA
 K L G Y A Y Q N V P I P W E N A K P V F

130 140 150 160 170 180
 CGAAGACAAAGTACCAAAATTTGGTGAAGTTGAGGTTAATGATGGAACCTTAAGAAAA
 R R T K V P K L V E V E V N D G N L R K

190 200 210 220 230 240
 TCACCGACTATCTTAAAGTTCCGACACAGAGTCCAGAAAAATACGTTAGCTTCCATTG
 S P T I L K V R Q Q S F R K Y V T F P L

250 260 270 280 290 300
 GTTTGAATAATACAGTGAGTGCTATTGTGAAGAGCCAAAGAAATCAAGGAGCAAGAAA
 V L N N T V S A I V K R P K K S R S K K

310 320 330 340 350 360
 GAGAAGGAAGAGGAGGAGGTTTGTAGTATTGAGGGGATTGACTTTGATATGAATATA
 E K E E E E E V L V I E G I E F D H N I

370 380 390 400 410 420
 GCCATTAAGTTTGTATTTATTAATGATGAAGATGCTAAGGTTGGGCCAGGGAATCT
 A I K P D V V I N D E D A K V G P G N T

430 440 450 460 470 480
 GAGTTTGTGGAGCTTTGTGAATGTCCCTCATTCTCCATGACACAGTAAACAGATT
 E F A G S F V N V P H S S H G H S N K I

490 500 510 520 530 540
 ATTACTTGTTAAGACTTGGTATAACTGATTGTTGGAGATTGGATGTCGAAGGCGAT
 I T C L R L G I T D L L E D L D V E G D

550 560 570 580 590 600
 GATAATATTGTGGTTACATTGGTCCAAATGTGGGAATGGACAAGTCAAAATCAATAAC
 D N I V V T L V P K C G N G Q V K I N N

610 620 630 640 650 660
 GTCGAGATAGTGTGGAAGATTGAAAAATTTCTACCATTGTTATGCACCGTCTGTGTTG
 V E I V F E D -

670 680 690
 AGCGACTTGAGAGGTAGATTTTATGTTTTT

DSRP2

FIGURE 3

10 20 30 40 50 60
 GAGGACATGGGGAAGCTTTTCTCCGCGGTGCGGATCCCTGTTTACGCCACCATTGC
 E D H G N F Y S A G R D P L E Y A H H C

70 80 90 100 110 120
 AACGTGGACCGCATGTGGAACTTTGGGAAACCTCTCGAGCGCAAGCGCAAGGACCCACC
 N V D R M W N V W K T L G G K R K D P T

130 140 150 160 170 180
 GACACCGATTGGCTGACGCTGAGTTCTCTTCTACGATGAAAACGCCGAGCTTGTGAGC
 D T D W L D A E F L F Y D E N A E L V S

190 200
 TGTAAAGTTCCGACAGCTTCAAC
 C K V R D S L N

DSRP8

10 20 30 40 50 60
 GAGGATATGGGGAATTTTCTCTCGGGGAGGGATCCGCTGTTTACTCTCACCAATTC
 E D H G N F Y S A G R D P L F Y S H H S

70 80 90 100 110 120
 AACGTGGACCGCATGTGTCTATATATAAGATAAGTTGGGAGGTACGGACATAGAAAA
 N V D R M W S I Y K D K L G G T D I E K

130 140 150 160 170
 TACCGACTGTGGACCGCAGCTTCTTATTCTACGACGAGAACAGAAATCTTCGTGC
 Y R L L D A E F L F Y D E N K N L R

DSRP12

FIGURE 4

10 20 30 40 50 60
 TTTTGGCGTTTCATCGATGCTTGTACTTGTACTTCCAGGAGAGATCGTGGGAAATTCATT
 F L F F H R W Y L Y F H E R I V G K F I

70 80 90 100 110 120
 GATGATCCCACTTTCGCTTACCATATTGGAATTGGGACCATCCAAAGGTATGCGTTTT
 D D P T F A L P Y W N W D H P K G H R F

130 140 150 160 170 180
 CCTGCCATGTATGATCGTGAAGGAGTTCCTTTTCGATGTAACAGCTGACCAAGTACAC
 P A H Y D R E G T S L F D V T R D Q S H

190 200 210 220 230 240
 CGAAATGGAGCAGTAATCGATCTTGGTTTTTTCGCAATGAAGTGAACAACTCAACTC
 R N G A V I D L G F P P G N E V E T T Q L

250 260 270 280 290 300
 CAGTTGATGAGCAATAATTTAACTAATGTACCGTCAATGGTAACTAATGCTCCATGT
 Q L M S N N L T L N Y R Q N V T N A P C

310 320 330 340 350 360
 CCTCGGATGTTCTTTGGCGGCTTATGATCTCGGGGTTAACTGAACTCCCGGAACT
 P R M F F G G P Y D L G V N T E L P G T

370 380 390 400 410 420
 ATAGAAACATCCCTCAGGTCCTGTCCACATCGTGTCTGACAGTGAGAGGTTCACT
 I E N I P H G P V H I W S G T V R G S T

430 440 450 460 470 480
 TGGCCAAATGCTGCAATATCAAAACGGTGAAGATATGGTCTTTTACTCAGCTGGTTG
 L P N G A I S N G E N M G H F Y S A G L

490 500 510 520 530 540
 GACCCGGTTTCTTTTGCATCAGCAATGTGGATCGGATGAGCGAATGGAAAGCG
 D P V F F C H H S N V D R M W S E W K A

550 560 570 580 590 600
 ACAGGAGGGAAGAAACCGATATCACAATAAGATTGGTTGAAGTCCGAGTCTTTTTC
 T G G K R T D I T H K D W L N S E F F F

610 620 630 640 650 660
 TATGATGAAATGAAACCTTACCGTGTGAAGTCAAGACTGTTTGGACAGCAAGAAAG
 Y D E N E N F Y R V K V R D C L D T K K

DSRF11

670 680 690 700 710 720
ATGGGATACGATTACAAACCAATGCCACACCATGGCTAACTTCAAGCCCTTAACAAAG
H G Y D Y K P I A T P W R N F K P L T K
730 740 750 760 770 780
CCTTCAGCTGGAAAGTGAATACAGCTTCACTTCCGCGAGTAGCAATGTATCCCATTTG
P S A G K V N T A S L P P A S N V F P L
790 800 810 820 830 840
GCTAACTCGACAAAGCAATTTGCTTTTCATCAATAGGCGGACTTCTGCAAGGACTCAA
A K L D K A I S F S I N R P T S S R T Q
850 860 870 880 890 900
CAAGAGAAAATGCACAAAGGAGATGTTGACATTCACTAGCATAGATATGATAACAGA
Q E K N A Q E E N L T F S S I R V D N R
910 920 930 940 950 960
GGGTACATAAGGTTGATGTGTTTTCGAACTGGACAAATAATGTGAATGCGAATGACCTT
G Y I R F D V F S N V D N N V N A N E L
970 980 990 1000 1010 1020
GACAGCGGAGTTTGGCGGAGTTATCAAGTTTGGCAGATGTTTATAGAGGATGAG
D K A E F A G S Y T S L P H V H R A G E
1030 1040 1050 1060 1070 1080
ACTAATCATATCGGAGCTGTTGATTTCCAGCTGGCGATAACGGAAGCTTGGAGGATATT
T N H I A T V D F G L A I T E L L E D I
1090 1100 1110 1120 1130 1140
GGTTTGGAGATGAAGATATATGCGGAGCTCTGCTGCCAAGAGAGCTGGTGAAGGT
G L E D E D T I A V T L V P K R G C E G
1150 1160 1170 1180 1190 1200
ATCTCCATTGAAGGTGCGAGCATCTTCCAGATGTTAATAGTCTCTCAATGATCT
I S I E G A T I S L A D C - L V B I E S
1210 1220 1230 1240 1250 1260
GCTGAGATTACACTTGTGAGATGATGCTCTGTTTGTGTTTCTGTTTCTGTTTCTCT
A E I T L - W M H L C F C F L V L F P F
1270 1280 1290 1300 1310 1320
CTGTTGAAATCAGCTTGTGCTGATTTCAATGAAGTTGTTTCAAGATAAATCACT
L L K S A L L L D F I E V V I Q E - I S
TACAA
Y

670 680 690 700 710 720
ATGGGGTACGATTACGACCAATGCCAACTCCATGGCGTAACTTCAACCAAAAACAAAG
H G Y D V A P M P T P W R N F K P K T K
730 740 750 760 770 780
GCATCAGTAGGAAAAGTGAATACAACTACACTCCCCCAGTGAACAAGGTATTCCCACTC
A S V G K V N T T T L P P V N K V F P L
790 800 810 820 830 840
ACGAAGATGGATAAAGCCATTTCATTTCCATCAATAGGCGCTGCTTCATCGCGGACTCAA
T K M D K A I S F S I N R P A S S R T Q
850 860 870 880 890 900
CAAGAGAAAATGAACAAGAGGAGATGTTAAGCTTCGATAACATAAATATGATAATAGA
Q E K N E Q E E N L T F D N I K Y D N R
910 920 930 940 950 960
GGGTATATAAGGTTGATGTATTTCTGAACTGGATAACAATGTGAATGCGAATGAGCTT
G Y I R F D V F L N V D N N V N A N E L
970 980 990 1000 1010 1020
GATAAGGCAAGCTTCCGCGGAGTTATAGTTTCCAGATGTTTACAGAGTTGGCGAG
D K A E F A G S Y T S L P H V H R V G E
1030 1040 1050 1060 1070 1080
AATGATCATACCGGAGCTTTACTTTCCAGCTGGCGATAACAGAACTGTTGGAGGACATT
N D H T A T V T F Q L A I T E L L E D I
1090 1100 1110 1120 1130 1140
GGTTTGGAGATGAAGAGCTATTGCGGCTGACTCTGCTACCAAGAAAGCTGGTGAAGGT
G L E D E D T I A V T L V P K K G C E G
1150 1160 1170 1180 1190 1200
ATCTCCATTGAAAATGTCAGATCAAGCTCTGGAATGTTAAGTACGTTCTCAATGAAAT
I S I E N V E I K L L D C - V R S Q L N
1210 1220 1230 1240 1250 1260
CTGCTGAGATTACAACTTGTATGTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCT
L L R L Q L - Y V F Y F C F S N - L F L
1270 1280 1290 1300 1310
TTGAAATCAGCTTGTATGTTTCTTGGAGTTGTTTCACTAATAAATCA
L K S A - C L I S L E L L F T N K I

10 20 30 40 50 60
TTCTTCCGTTCCACCGATGGTACTTATCTTCTACGAGAGATATTGGGAAACTCATC
F L P F H R W Y L Y F Y E R I L G K L I
70 80 90 100 110 120
GATGATCCAACTTTCGCTTACCATATTGGAATGGGATCATCAAAGGGCATGCGTTTA
D D P T P A L P Y W N W D H F K G M R L
130 140 150 160 170 180
CCTCCCATGTTCCGATCGTGAAGGAAGTCTATTTCGGAAGAAAGCGGAATCAACAAGTC
P P M F D R E G T E I Y D E R R N Q Q V
190 200 210 220 230 240
CGTAACGGAACCGTTATGATCTTGGTTCATTTCGGGCAAGGTCGAAGCAACTCAACTC
R N G T V M D L C S F G D R V Q T T Q L
250 260 270 280 290 300
CAGTGTAGGCAATAATTAACTAATGACCTCAATGGAATGGAATGCTCCATGT
Q L N S N N L T L M Y R Q N V T N A F C
310 320 330 340 350 360
CCTCTTGTGTTCTTCGCTGCGGCTTACCTTTCGGGAATAACCTGGAAGCCCGGGAAC
P L L P F G A P Y V L G N N V E A P G T
370 380 390 400 410 420
ATTGAAACATCCCTCATATACCTGCTCATTTTCGGGATGCTACAGTACGCTTCAACA
I E N I P H I P V N I W A G T V R G S T
430 440 450 460 470 480
TTTCTAATGCTGATACCTCATACGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
F P N G D T S Y G E D M G N P Y S A G L
490 500 510 520 530 540
GACCCGGTTTCTATTGTCACCAAGGCAATGGAAGCTATGGAATGGAATGGAAGCTA
D F V F Y C H N G N V D R M W N E W K A
550 560 570 580 590 600
ATAGAGGTAAGAGAGGGAATTTATCAGAAAGAAAGATGTTGAACTGAACTGCTCTTT
X G G K R R D L S E K D W L N S E F F F
610 620 630 640 650 660
TATGATCAAAACAAAAGCTTACCGTGTGAAAAGTCCGAGACTGTTTGGAGCCGGAAGAA
Y D E N K K P Y R V K V R D C L D A K K

BDSRACE1

10 20 30 40 50 60
TTTTTTTATTCAAAGCTAGCAATAATGGCAAGCTTGGCAATAGTTGTAGTACATCC
M A S L C N S C S T S
70 80 90 100 110 120
CTCAAACTCTTTTACTTCTTCTCCACTTCTTTTAACTTCCACTCCTTAAACCTCTCAA
L K T P F T S S S T S L T S T P K P S Q
130 140 150 160 170 180
CTTTTCATCATGGAAGCAATTAACCAATGTTCAAAGTTCATGCTGTTTACCAATAT
L F I N G K R N Q M F K V S C M V T N N
190 200 210 220 230 240
AACGGTGACCAAAACCAAAAGCTTGAAGCAAGATCTGTTGATCGAAGAAATGTTCTTT
N G D Q N Q N V E T N S V D R R N V L L
250 260 270 280 290 300
GGCTTAGGCTGCTTATGCTGCTGCTAATGCTATACATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
G L C G L Y G V A N A I P L A A S A T P
310 320 330 340 350 360
TCTCCACTCTGATCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
S F P P D L S S C S I A R I N E T H V V
370 380 390 400 410 420
CCGTACAGTCTTTCGCGGCTAAGCCTGATGATGGAAGAAAGTTCCTGATTAACAAGTTC
P Y S C C A P K P D D N E K V P Y Y K F
430 440 450 460 470 480
CCTTTATGACTAAGCTCCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
F S N T K L R V R Q F A H E A N E E Y I
490 500 510 520 530 540
GCAATGCAATTTGCGGCTAGCAAGATGAGGATCTGATAGCAAGCAAGCTTTAAAG
A K Y N L A V S K N R D L D K T Q P L N
550 560 570 580 590 600
CCTATTGCTTTAAGCAACAGCTAATATCAATTTGCTTATTTGTAACGCTGCTTATAGA
P I G F K Q Q A N I H C A Y C N G A Y R
610 620 630 640 650 660
ATTGCTGCAAGAGTTACAGCTTCAATATCTTGGCTTTCTTCCGCTTCCATAGAGG
I G G K E L Q V N N S W L F P F P H R W

平成 6年 1月17日

特許庁長官 麻 生 渡 殿



1. 特許出願の表示

PCT/AU92/00356

2. 発明の名称

ポリフェノールオキシダーゼ遺伝子

3. 特許出願人

住 所 オーストラリア連邦オーストラリアン・キャピタル・
テリトリ 2601, キャンベル, ライムストーン・
アベニュー (番地なし)
名 称 コモンウェルス・サイエンティフィック・アンド・
インダストリアル・リサーチ・オーガナイゼーション

4. 代理人

住 所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新大手町ビル 206区
電 話 3270-5641~6646
氏 名 (2770) 井原士 湯 漢 恭 三

5. 補正書の提出日

平成 5年 5月 4日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の翻訳文

1通



670 680 690 700 710 720
TACTTGTACTTCTACGAGAGAAATCGTGGGAAATTCATTGATGCAACTTTCGCTTTG
Y L Y F Y E R I V G K F I D D A T F A L
730 740 750 760 770 780
CCATATTGGAATTGGACCATCCAAAGCGTATGCGTTTCTGCGCATGTATGATCGTGAA
F Y W N W D H P K G M R F F A N Y D R E
790 800 810 820 830 840
GGGACTTCCCTTTTCGATGTAAACACGTGACCAAGTCCACGAAATGGAGCAGTAATCGAT
G T S L F D V T R D Q S H R N G A V I D
850 860 870 880 890
CTTGGTTTATCGGCAATGAAGTCGAAACAACTCAACTCCAGTTGATGAGCA
L G F I G N E V E T T Q L Q L N S

3.4条補正

(差し替え用紙第2、3、3a頁の翻訳文: 原翻訳文第1頁26行~第3頁25行と差し替える)

これらの場合、PPOの量を増大させて、望ましい程度の褐変または風味成分の変化を生じさせることが望ましいことがある。

正常な植物の成長および発育におけるPPOの役割は、現在のところ理解されていない。この酵素の増大した濃度が植物病原体に対する増大した耐性と相関している場合が多数存在している。当然の結果として、PPO活性の水増大させる植物の遺伝子操作は、病原体および有害生物に対する有用な耐性を与えることができる。

グレープバイン (grapevine) のPPO遺伝子は、成熟タンパク質のN末端の上流の追加の103アミノ酸をコードする。この領域は、葉緑体トランシトペプチドの性質を有し、しかもタンパク質が葉緑体中に引き入れられ且つ成熟PPOタンパク質を生産するように処理されるように設計されたものであると考えられる。この遺伝子による植物の形質転換は、したがって、他種においてグレープバインPPOの正しい傾斜および成熟を生じ且つこれらの組織の色素体中で活性グレープバインPPO酵素の蓄積を引起すことができる。

本明細書中で用いられる「PPOをコードしている遺伝子」、「PPOをコードする遺伝子」または「PPO遺伝子」は、PPO遺伝子またはそれと実質的に相同の配列を意味すると理解されるべきである。

本発明の第一の態様において、植物ポリフェノールオキシダーゼ (PPO) 活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを提供する。

DND配列は、トランシトペプチドをコードする植物PPO遺伝子のプレ配列を含んでいてよい。

DND配列は修飾されていてよい。DNA配列は、植物PPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードする配列またはそのフラグメントを含んでいてよい。

い。

DNA配列は、触媒部位を更に含んでいてよい。

或いは、プレ配列は、植物PPO活性を有するポリペプチドを他の細胞区分に向けるように他の標的配列によって置き換えることができる。

DNA配列は、図1に図示したような、推定上の葉緑体トランシト配列および成熟グレープバインPPOタンパク質を含んでいてよい。

DNA配列は、図2に図示したような、ソラマメの葉のPPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含んでいてよい。

DNA配列は、図3に図示したような、リンゴ果実PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含んでいてよい。

DNA配列は、図4に図示したような、ジャガイモ塊茎PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含んでいてよい。

本発明のもう一つの態様において、植物PPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードする配列を含むDNA配列またはそのフラグメントを提供する。

本発明のもう一つの態様において、植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含む組換えDNAプラスミドを製造する方法であって、

PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメント; および

プラスミド発現ベクターを提供し; そして

該DNA配列および該プラスミド発現ベクターを反応させて、該DNA配列を該プラスミド発現ベクター中に配置することを含む上記方法を提供する。

PPOをコードするDNA配列は、例えば、植物試料から単離されたポリアダニル化RNAから生成することができる。植物は、リンゴ、ジャガイモ、ブドウおよび豆から選択することができる。好ましくは、植物試料は、スルタナブドウ果実、ソラマメの葉、リンゴの外皮若しくは皮層またはジャガイモ塊茎から単離される。

PPOをコードするDNA配列を提供するために、本発明の好ましい態様において、組換えDNAプラスミドの製造方法は、

植物PPO活性を有するポリペプチド源を提供し；
植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするポリアデニル化RNAをそこから単離し；そして
コピーDNA (cDNA) を構築するように該ポリアデニル化RNAを処理する予備工程を含むことができる。
ポリアデニル化RNAの単離は、オリゴ-dTスパンカラムを用いて実施することができる。

(差し替え用紙第5、6、6a頁の翻訳文；原翻訳文第4頁22行～第7頁1行と差し替える)

或いは、本発明のこの態様にしたがってcDNAを構築するようにポリアデニル化RNAを処理する工程は、
該ポリアデニル化RNAを逆転写酵素およびPPO特異的プライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し；
そのように生成されたcDNAをターミナルdトランスフェラーゼで処理して、ポリアデニン尾配列を該cDNAの3'末端に結合し；そして、
そのように生成されたポリアデニル化cDNAをPCRによって増幅させることを含むことができる。
ポリアデニル化RNAを逆転写酵素で処理する工程は、ブドウPPOに関して配列

5'-AATCTTTGTGGTGAATGGCG

を有するPPO特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いることができるしまたは該PPO特異的プライマーはジャガイモ塊茎PPOに関して配列

5'-GACGGTACATTAGTCTTAAT

を有するオリゴヌクレオチドプライマーである。

cDNAを増幅させる工程は、配列

5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTCTTTTCTTTT

を有するオリゴヌクレオチドアダプタープライマーおよびブドウPPOに関して配列

5'-ACCATCAGGCACGGTGGCGG

またはジャガイモ塊茎PPOに関して配列

5'-TGCTCATCACTGGAGTTGAG

を有するPPO特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いることができる。

二本鎖cDNAのクローニングのためのプラスミド発現ベクターは任意の適当な種類であってよい。プラスミドベクターブルースク립ト (Bluescript) SK⁺は適当であることが分かっている。

クローニング工程は任意の適当な形式をとってよい。好ましい形式はcDNAを、例えば、クローニングフラグメントでプラント末端付きにし；
そのように生成されたcDNAを、例えば、アガロースゲル上で分別し；
予想の寸法のフラグメントを、例えば、ゲルから単離し；そして
該フラグメントを適当な制限酵素部位、例えば、ブルースクリプトSK⁺ベクターのHindIIIまたはEcoRI部位に連結することを含むことができる。
このように生成されたクローンを試験するために、適当な微生物をプラスミド発現ベクターによって形質転換することができ、該微生物を培養し、そしてそこにおいてコードされたポリペプチドを発現させることができる。微生物大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5は適当であることが分かっている。
本発明のもう一つの態様において、植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含む組換えDNAプラスミドであって、単細胞生物において複製され、転写され、そして翻訳されることができる上記プラスミドを提供する。

プラスミド発現ベクターは任意の適当な種類であってよい。組換え体プラスミドは、PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列の上流の構成的プロモーター要素を含むことができる。

本発明のもう一つの態様において、植物組織中のPPO活性の水準を低下させる方法であって、

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする修飾遺伝子またはそのフラグメントを含むDNA構築物；および

植物試料を提供し；そして

該DNA構築物を該植物試料中に導入して形質転換した植物を製造することを含む上記方法を提供する。

DNA構築物は、植物PPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードしている配列またはそのフラグメントを含むことができる。DNA構築物は、植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子またはそのフラグメントを含み、触媒開裂部位を組込んでいることができる。

植物は任意の適当な種類であってよい。好ましい態様において、植物は、グレ

ープリン、ジャガイモ、リンゴおよび豆を含む群より選択することができる。

本発明のもう一つの態様において、植物組織中のPPO活性の水準を増大させる方法であって、

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子またはそのフラグメントを含むDNA構築物；および

植物試料を提供し；そして

該DNA構築物を該植物試料中に導入して形質転換した植物を製造することを含む上記方法を提供する。

DNA構築物は、植物PPO遺伝子のブレ配列をコードしているDNA配列またはそのフラグメントを含むことができる。

植物は任意の適当な種類であってよい。好ましい態様において、植物は、タバコ、ソラマメ、トマト、茶、コーヒーおよびココアから成る群より選択することができる。

(差し替え用紙第8、9、10、10a頁の翻訳文：原翻訳文第7頁28行～第10頁20行と差し替える)

本発明のもう一つの態様において、形質転換した植物であって、正常なPPO遺伝子の発現を変更しうる合成遺伝子を含む上記植物を提供する。

植物は任意の適当な種類であってよい。好ましい態様において、植物は、グレープバイン、ジャガイモ、リンゴ、タバコ、豆、モモ、ナシおよびアンズから成る群より選択することができる。

本発明のもう一つの態様において、PPOをコードしている配列またはそのフラグメントを含む植物用ワクチンを提供する。

本発明のもう一つの態様において、植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含むDNAプローブを提供する。

プローブは、任意の適当な方式で標識することができる。放射性標識または非放射性標識を用いることができる。便宜上、プローブは、適当なプラスミドベクター中のクローニングされたインサートの形で提供することができる。

グレープバインPPO配列を用いて、この遺伝子を他の種から得るようにPCRで用いるための一般的な目的オリゴヌクレオチドプライマーを設計することができる。植物PPOタンパク質は補欠分子族として網を含むことが知られており、そしてヘモシアニンおよびチロシナーゼタンパク質からの配列に対して同族を示す、これらのタンパク質上の解結合性部位に対応するブドウタンパク質配列の二つの領域が識別された。これらの領域は種々の生物間で明らかに保存されるので、それらは、他の植物PPO遺伝子を得るためにプローブおよびプライマーを設計するのに適している。

したがって、本発明の更にもう一つの態様において、PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

cDNAまたはゲノムライブラリー；および

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含むDNAプローブを提供し；そして

発現ライブラリー；および

PPO活性を有する精製ポリペプチドに対して生じた多クローン性抗体を提供し；そして

該多クローン性抗体と該発現ライブラリーとを反応させて、PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを有するクローンを識別することを含む上記方法を提供する。

本発明のもう一つの態様において、PPOタンパク質の精製法であって、

植物試料；

デタージェント；および

1種類またはそれ以上のクロマトグラフィーカラムを提供し；

該植物試料を該デタージェントで抽出し；

そのように生成された抽出物を硫酸アンモニウムで処理し；そして

そのように生成された抽出物を、それをクロマトグラフィーカラムに通すことによって分別することを含む上記方法を提供する。

植物試料は任意の適当な種類であってよい。植物試料はグレープバイン果実であってよい。この組織は高濃度のPPOを含み、成熟ブドウ果実の果汁中の大部分のPPO活性は固形物によるものであり、遠心分離によって果汁から分離した後、デタージェントによって可溶化することができる。植物試料は豆の葉であってよい。

デタージェントは陽イオン性であってよい。臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム(CTAB)デタージェントは適当であることが分かっている。

クロマトグラフィーカラムはセファロース基材であってよい。3種類のクロマトグラフィーカラムを用いることができる。Q-セファロースに続いてフェニル-セファロース、次にヒドロキシルアパタイトが適当であることが分かっている。

本発明のもう一つの態様において、N末端アミノ酸配列

APIQAPDISKCGTATVPDGVTP

を有する実質的に純粋な状態の植物PPO活性を有するポリペプチドを提供する。

ここで、本発明を実施例および図面に関して更に充分に記載する。しかしながら、以下の説明が単に例示するためのものであることは理解されるべきであり、

該プローブをゲノムライブラリーとハイブリッド形成させて、該DNA配列を有するクローンを識別することを含む上記方法を提供する。

DNAプローブは、異種間に高度に保存されるリンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子のフラグメントを含むDNA配列を含むことができる。

DNAプローブは、植物種からの全cDNA；および

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子と特異的にハイブリッド形成し且つ異種間に高度に保存されるリンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子の配列を含む2種類またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを提供し；そして

PCRを行なって、植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを増幅させることを含む方法によって製造することができる。

オリゴヌクレオチドプライマーは、植物PPO活性を有するポリペプチド上の解結合性部位に対応するDNA配列を含むことができる。

本発明のもう一つの態様において、PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

植物種から単離されたmRNA；

ポリ-dTアダプタープライマー；および

2種類またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを提供し；

mRNAを逆転写酵素およびアダプタープライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し；そして

そのように生成されたcDNAを、オリゴヌクレオチドプライマーおよびポリメラーゼ連鎖反応を用いて増幅させることを含む上記方法を提供する。

好ましい態様において、オリゴヌクレオチドプライマーは、リンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子配列に基づくことができる。

本発明のもう一つの態様において、PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

いかなる場合にも上記の本発明の一般性を制限するものとしてとるべきではない。

図面において、

図1：

推定上の葉緑体トランシット配列および成熟グレープバインPPOタンパク質双方をコードする複合完全長GPO1 cDNAヌクレオチド配列および誘導タンパク質配列。

翻訳開始部位をボールド体で示し、成熟タンパク質のN末端に星印を付ける。

(原請求の範囲を以下の新請求の範囲に全文差し替える：原翻訳文第23～28頁)

請求の範囲

1. 植物ポリフェノールオキシダーゼ (PPO) 活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメント。
2. トランシットペプチドをコードする植物PPO遺伝子のプレ配列を含むDNA配列。
3. トランシットペプチドをコードする植物PPO遺伝子のプレ配列を含む請求項1に記載のDNA配列。
4. 植物PPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードする配列またはそのフラグメントを含む請求項1に記載のDNA配列。
5. 植物PPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードする配列を含むDNA配列またはそのフラグメント。
6. 触媒開裂部位を組込んでいる請求項1に記載のDNA配列。
7. プレ配列が、植物PPO活性を有するポリペプチドを他の細胞区分に向けてるように他の標的配列によって置き換えられている請求項3に記載のDNA配列。
8. 図1に図示したような、推定上の葉緑体トランシットペプチド配列および成熟グレープバインPPOポリペプチドをコードする配列を含む請求項3に記載のDNA配列。
9. 図2に図示したような、ソラマメの葉のPPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む請求項1に記載のDNA配列。
10. 図3に図示したような、リンゴ果実のPPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む請求項1に記載のDNA配列。
11. 図4に図示したような、ジャガイモ塊茎のPPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む請求項1に記載のDNA配列。
12. 植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそ

5'-CCATTCAGGCGCCGATATTCAGTGTGG;

豆cDNAの増幅用に用いられる場合に配列

5'-GCGGATCCTT[CT]TA[CT]GA[CT]GA[GA]AA[CT]AA;

リンゴcDNAの増幅用に用いられる場合に配列

(5'-GCGAATTCGA[AG]GA[TC]ATGGGAA[TC]TT[TC]TA);

そしてジャガイモcDNAの増幅用に用いられる場合に配列

GEN3: (5'-GCGAATTCCTT[TC]TC[TC]TTCCTT[TC]CA[TC][AC]G)

GEN7: (5'-GCGAATTCAT[TC]GTGA[TC][AC]GATGTGG)

を有する請求項18に記載の方法。

20. ポリアデニル化RNAを処理する工程が、

該ポリアデニル化RNAを逆転写酵素およびPPO特異的プライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し;

そのように生成されたcDNAをターミナルdトランスフェラーゼで処理して、ポリアデニン尾部配列を該cDNAの3'末端に結合し;そして

そのように生成されたポリアデニル化cDNAを、PCRを用いて増幅させることを含む請求項15に記載の方法。

21. PPO特異的プライマーが、ブドウPPOに関して配列

5'-AATCTTTCGTGCTGACTGGCG

を有するオリゴヌクレオチドプライマーでありまたは該PPO特異的プライマーが、ジャガイモ塊茎PPOに関して配列

5'-GACGGTACATGATCTTAAT

を有するオリゴヌクレオチドプライマーである請求項20に記載の方法。

22. cDNAを増幅させる工程が、配列

5'-GACTCGAGTCGACATCGATTCTTTTCTTTTCTTTT

を有するオリゴヌクレオチドアダプタープライマーおよびブドウPPOに関して配列

5'-ACCATCAGGCGACGGTGGGG

またはジャガイモ塊茎PPOに関して配列

5'-TGCTCATCAACTGGAGTTGAG

のフラグメントを含む組換えDNAプラスミドを製造する方法であって、

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメント;および

プラスミド発現ベクターを提供し;そして

該DNA配列および該プラスミド発現ベクターを反応させて、該DNA配列を該プラスミド発現ベクター中に配置することを含む上記方法。

13. DNA配列を、植物試料から単離されたポリアデニル化RNAから生成する請求項12に記載の方法。

14. 植物試料を、リンゴ、ジャガイモ、ブドウおよび豆から選択する請求項13に記載の方法。

15. 植物PPO活性を有するポリペプチド源を提供し;

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするポリアデニル化RNAをそこから単離し;そして

コピーDNA (cDNA) を構築するように該ポリアデニル化RNAを処理する予備工程を含む請求項13に記載の方法。

16. ポリアデニル化RNAを処理する工程が、

該ポリアデニル化RNAを逆転写酵素およびアダプタープライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し;そして

そのように生成されたcDNAを、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて増幅させることを含む請求項15に記載の方法。

17. アダプタープライマーが、配列

5'-GACTCGAGTCGACATCGATTCTTTTCTTTTCTTTT

を有するオリゴヌクレオチドアダプターである請求項16に記載の方法。

18. cDNAを増幅させる工程が、配列

5'-GACTCGAGTCGACATCG

を有するアダプタープライマーおよび5'末端プライマーを用いる請求項17に記載の方法。

19. 5'末端プライマーが、ブドウcDNAの増幅用に用いられる場合に配列

を有するPPO特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いる請求項21に記載の方法。

23. プラスミド発現ベクターがプラスミドベクターブルースクリプトSK⁺であり且つDNA配列がcDNA配列である請求項22に記載の方法。

24. DNA配列をプラスミド発現ベクター中に配置する工程が、

cDNAをプラント末端付きにし;

そのように生成されたプラント末端付きcDNAを分別し;

予選の寸法のフラグメントを単離し;そして

該フラグメントをブルースクリプトSK⁺ベクターの適当な制限酵素部位に連結することを含む請求項23に記載の方法。

25. 植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含む組換えDNAプラスミドであって、単細胞生物において複製され、転写され、そして翻訳されることができる上記プラスミド。

26. DNA配列の上流の構成的プロモーター要素を含む請求項25に記載の組換えプラスミド。

27. DNA配列が、ブドウ、豆、リンゴまたはジャガイモ塊茎のPPO活性を有するポリペプチドをコードする請求項26に記載の組換えプラスミド。

28. 植物組織中のPPO活性の水準を低下させる方法であって、

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする修飾遺伝子またはそのフラグメントを含むDNA構築物;および

植物試料を提供し;そして

該DNA構築物を該植物試料中に導入して形質転換した植物を製造することを含む上記方法。

29. DNA構築物が、植物PPO遺伝子に対するアンチセンスmRNAをコードする配列またはそのフラグメントを含む請求項28に記載の方法。

30. DNA構築物が、植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子またはそのフラグメントを含み、触媒開裂部位を組込んでいる請求項28に記載の方法。

31. 植物試料を、グレープバイン、ジャガイモ、リンゴおよび豆から選択さ

特表平7-501686 (16)

れた植物から得る請求項28に記載の方法。

32. DNA構築物が、

DNA配列を導入された二成分ベクター；および

果実または野菜の皮すなわち外皮に特異的であるプロモーターを含む請求項28に記載の方法。

33. 植物組織中のPPO活性の水準を増大させる方法であって、

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子またはそのフラグメントを含むDNA構築物；および

植物試料を提供し；そして

該DNA構築物を該植物試料中に導入して形質転換した植物を製造することを含む上記方法。

31. DNA構築物が、トランスジエントベクターをコードする植物PPO遺伝子のプレ配列をコードしているDNA配列またはそのフラグメントを含む請求項33に記載の方法。

35. プレ配列が、植物PPO活性を有するポリペプチドを他の細胞区分に向けてるように他の標的配列によって置き換えられている請求項34に記載の方法。

36. 植物試料を、タバコ、ソラマメ、トマト、茶、コーヒーおよびココアから選択された植物から得る請求項33に記載の方法。

37. DNA構築物が、

DNA配列を導入された二成分ベクター；および

果実または野菜の皮すなわち外皮に特異的であるプロモーターを含む請求項33に記載の方法。

38. 植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含むDNAプローブ。

39. PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

cDNAまたはゲノムライブラリー；および

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードするDNA配列またはそのフラグメントを含むDNAプローブを提供し；そして

該多クローン性抗体と該発現ライブラリーとを反応させて、PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを有するクローンを識別することを含む上記方法。

45. N末端アミノ酸配列

APIQAFDISKCGTATVPDGVTP

を有する、実質的に純粋な状態の植物PPO活性を有するポリペプチド。

該プローブを該ゲノムライブラリーとハイブリッド形成させて、該DNA配列を有するクローンを識別することを含む上記方法。

40. DNAプローブが、異種間に高度に保存されるリンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子のフラグメントを含むDNA配列を含む請求項39に記載の方法。

41. DNAプローブを、

植物種からの全cDNA；および

植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子と特異的にハイブリッド形成し且つ異種間に高度に保存されるリンゴ、ジャガイモ、ブドウまたは豆のPPO遺伝子の配列を含む2種類またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを提供し；そして

PCRを実施して、植物PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを増幅させることを含む方法によって製造する請求項39に記載の方法。

42. オリゴヌクレオチドプライマーが、植物PPO活性を有するポリペプチド上の解離性部位に対応するDNA配列を含む請求項41に記載の方法。

43. PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

植物から単離されたmRNA；

2種類またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを提供し；

該mRNAを逆転写酵素およびアダプタープライマーで処理して第一鎖cDNAを生成し；そして

そのように生成されたcDNAを、オリゴヌクレオチドプライマーおよびポリメラーゼ連鎖反応を用いて増幅させることを含む上記方法。

44. PPO活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列またはそのフラグメントを植物種から単離する方法であって、

発現ライブラリー；および

PPOを有する精製ポリペプチドに対して生じた多クローン性抗体を提供し；そして

国際調査報告

International publication No.
PCT/JP92/00356

| | | |
|---|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. ⁷ C12N 12/03 1/02 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC C12N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched AU: C12N 12/03 5/02 Electronic data base consulted during the international search (name of data base, and where practicable, search terms used) DERIVENT DATABASE; WHAT-KEYWORDS: POLYPHENOL OXIDASE, PPO, CATECHOL OXIDASE, TYROSINASE, SUPERNATANT OXIDASE, NOT KEYWORDS: CATECHOL OXIDASE, POLYPHENOL OXIDASE, PPO, SEQUENCE, PLASMID, DNA, CDA, RECOMBINANT CHEMICAL ABSTRACTS; STM DATABASE AMINO ACID SEQUENCE; CADA-KEYWORDS: TYROSINASE, POLYPHENOL OXIDASE, PPO, BROWNING | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category ^a | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to Claim No. |
| X | AU.A. 8154747 (DONALD OUTHRIE FOUNDATION FOR MEDICAL RESEARCH) 7 April 1992 (07.04.92) pages 1, 20-21, claims 1, 8 and 9 Derwent BIOC Online Abstract Accession no. 90-12612 Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology, 1990 Meeting, page 169, 1990, Williams et al., "Molecular cloning and partial characterization of the polyphenol-oxidase (PPO) gene of Corchorus verticillatus" Series Abstracts | 1, 25 |
| X | Derwent BIOC Online Abstract Accession no. 90-12612 Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology, 1990 Meeting, page 169, 1990, Williams et al., "Molecular cloning and partial characterization of the polyphenol-oxidase (PPO) gene of Corchorus verticillatus" Series Abstracts | 1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuations of Part C. <input checked="" type="checkbox"/> See parent family sheet. | | |
| ^a Special categories of cited documents: ¹ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ² documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ³ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁴ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁵ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁶ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁷ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁸ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁹ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ¹⁰ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ¹¹ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ¹² documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ¹³ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ¹⁴ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ¹⁵ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ¹⁶ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ¹⁷ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ¹⁸ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ¹⁹ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ²⁰ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ²¹ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ²² documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ²³ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ²⁴ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ²⁵ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ²⁶ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ²⁷ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ²⁸ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ²⁹ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ³⁰ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ³¹ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ³² documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ³³ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ³⁴ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ³⁵ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ³⁶ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ³⁷ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ³⁸ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ³⁹ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁴⁰ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁴¹ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁴² documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁴³ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁴⁴ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁴⁵ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁴⁶ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁴⁷ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁴⁸ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁴⁹ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁵⁰ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁵¹ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁵² documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁵³ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁵⁴ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁵⁵ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁵⁶ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁵⁷ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁵⁸ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁵⁹ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁶⁰ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁶¹ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁶² documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁶³ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁶⁴ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁶⁵ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁶⁶ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁶⁷ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁶⁸ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁶⁹ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁷⁰ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁷¹ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁷² documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁷³ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁷⁴ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁷⁵ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁷⁶ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁷⁷ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁷⁸ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁷⁹ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁸⁰ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁸¹ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁸² documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁸³ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁸⁴ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁸⁵ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁸⁶ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁸⁷ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁸⁸ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁸⁹ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁹⁰ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁹¹ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁹² documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁹³ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁹⁴ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁹⁵ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁹⁶ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁹⁷ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁹⁸ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ⁹⁹ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance ¹⁰⁰ documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | | |
| Date of the actual completion of the international search 23 October 1992 (22.10.92) | | Date of mailing of the international search report 5 July 1993 (03.07.93) |
| Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200 WOODEN HILL 5046 AUSTRALIA Facsimile No. 08 3557929 | | Authorized officer R. O'SHEA Telephone No. (08) 3553515 |

Form PCT/ISA/210 (transmission of first sheet (2)) (July 1992) English

| DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|-------------------------------------|---|------------------------|
| Category | Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage | Reference to Claim No. |
| A | Derwent WPAI Online Abstract Accounts no. 87-294828/42, JP.A. 63205783 (AIRCROFTO KK) 6 March 1996 (06.03.96) | |

Form PCT/ISA/210 (continuation of annex 2A)(July 1992)

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

| Patent Document Cited in Search Report | | Patent Family Member | | | |
|--|----------|----------------------|----------|----|---------|
| AU | 81547/87 | CA | 1293940 | EP | 200304 |
| | | WO | 86/02272 | US | 4898214 |

END OF ANNEX

Form PCT/ISA/210 (patent family annex)(July 1992) replace

フロントページの続き

(72) 発明者 ドライ, イアン・バリー
オーストラリア連邦サウス・オーストラリ
ア州5039, メルローズ・パーク, キングス
トン・アベニュー 111

PCTWORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

| | | |
|---|-----------|---|
| (51) International Patent Classification ⁶ : C12N 15/82, 15/29, A01H 5/00 | A2 | (11) International Publication Number: WO 96/40951 (43) International Publication Date: 19 December 1996 (19.12.96) |
| (21) International Application Number: PCT/US96/09911 (22) International Filing Date: 7 June 1996 (07.06.96) (30) Priority Data: 08/487,087 7 June 1995 (07.06.95) US (71) Applicant: CALGENE, INC. [US/US]; 1920 Fifth Street, Davis, CA 95616 (US). (72) Inventors: McBRIDE, Kevin; 1309 Marina Circle, Davis, CA 95616 (US). STALKER, David, M.; 2736 Cumberland Place, Davis, CA 95616 (US). (74) Agents: SCHWEDLER, Carl, J. et al.; Calgene, Inc., 1920 Fifth Street, Davis, CA 95616 (US). | | (81) Designated States: AU, CA, CN, JP, KG, KZ, MX, TJ, TM, TR, UZ, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Published <i>Without international search report and to be republished upon receipt of that report.</i> |
| (54) Title: USE OF OVARY-TISSUE TRANSCRIPTIONAL FACTORS | | |
| (57) Abstract Novel DNA constructs are provided which may be used as molecular probes or inserted into a plant host to provide for modification of transcription of a DNA sequence of interest in ovary tissue, particularly in very early fruit development. The DNA constructs comprise a transcriptional initiation regulatory region associated with gene expression in ovary tissue from immediately prior to anthesis through flower senescence. | | |

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

| | | | | | |
|----|--------------------------|----|--|----|--------------------------|
| AM | Armenia | GB | United Kingdom | MW | Malawi |
| AT | Austria | GE | Georgia | MX | Mexico |
| AU | Australia | GN | Guinea | NE | Niger |
| BB | Barbados | GR | Greece | NL | Netherlands |
| BE | Belgium | HU | Hungary | NO | Norway |
| BF | Burkina Faso | IE | Ireland | NZ | New Zealand |
| BG | Bulgaria | IT | Italy | PL | Poland |
| BJ | Benin | JP | Japan | PT | Portugal |
| BR | Brazil | KE | Kenya | RO | Romania |
| BY | Belarus | KG | Kyrgyzstan | RU | Russian Federation |
| CA | Canada | KP | Democratic People's Republic of Korea | SD | Sudan |
| CF | Central African Republic | KR | Republic of Korea | SE | Sweden |
| CG | Congo | KZ | Kazakhstan | SG | Singapore |
| CH | Switzerland | LI | Liechtenstein | SI | Slovenia |
| CI | Côte d'Ivoire | LK | Sri Lanka | SK | Slovakia |
| CM | Cameroon | LR | Liberia | SN | Senegal |
| CN | China | LT | Lithuania | SZ | Swaziland |
| CS | Czechoslovakia | LU | Luxembourg | TD | Chad |
| CZ | Czech Republic | LV | Latvia | TG | Togo |
| DE | Germany | MC | Monaco | TJ | Tajikistan |
| DK | Denmark | MD | Republic of Moldova | TT | Trinidad and Tobago |
| EE | Estonia | MG | Madagascar | UA | Ukraine |
| ES | Spain | ML | Mali | UG | Uganda |
| FI | Finland | MN | Mongolia | US | United States of America |
| FR | France | MR | Mauritania | UZ | Uzbekistan |
| GA | Gabon | | | VN | Viet Nam |

USE OF OVARY-TISSUE TRANSCRIPTIONAL FACTORS

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application is a continuation in part of United States application Serial No. 08/487,087 filed June 7, 1995, which is a continuation-in-part of Application Serial No. 998,158 filed December 29, 1992, which is a continuation in part of United States application Serial No. 554,195 filed July 17, 1990, which is a continuation-in-part of United States application Serial No. 382,518, filed July 19, 1989, which applications are incorporated herein by reference.

INTRODUCTION15 Technical Field

This invention relates to methods of using *in vitro* constructed DNA transcription or expression cassettes capable of directing ovary-tissue transcription of a DNA sequence of interest in plants to produce ovary-derived cells having an altered phenotype, and to methods of providing for or modifying existing color in various plant tissues or parts. The invention is exemplified by methods of using ovary tissue promoters for altering the color phenotype of cotton fibers, and cotton fibers produced by the method.

Background

In general, genetic engineering techniques have been directed to modifying the phenotype of individual prokaryotic and eukaryotic cells, especially in culture.

Plant cells have proven more intransigent than other eukaryotic cells, due not only to a lack of suitable vector systems but also as a result of the different goals involved. For many applications, it is desirable to be
5 able to control gene expression at a particular stage in the growth of a plant or in a particular plant part. For this purpose, regulatory sequences are required which afford the desired initiation of transcription in the appropriate cell types and/or at the appropriate time in
10 the plant's development without having serious detrimental effects on plant development and productivity. It is therefore of interest to be able to isolate sequences which can be used to provide the desired regulation of transcription in a plant cell during the growing cycle of
15 the host plant.

One aspect of this interest is the ability to change the phenotype of particular cell types, such as differentiated epidermal cells that originate in ovary tissue, i.e. cotton fiber cells, so as to provide for
20 altered or improved aspects of the mature cell type. In order to effect the desired phenotypic changes, transcription initiation regions capable of initiating transcription only in early ovary development are used. These transcription initiation regions are active prior to
25 the onset of pollination and are less active or inactive, before fruit enlargement, tissue maturation, or the like occur.

Relevant Literature

A class of fruit-specific promoters expressed at or during anthesis through fruit development, at least until the beginning of ripening, is discussed in European

5 Application 88.906296.4, the disclosure of which is hereby incorporated by reference. cDNA clones that are preferentially expressed in cotton fiber have been isolated. One of the clones isolated corresponds to mRNA and protein that are highest during the late primary cell

10 wall and early secondary cell wall synthesis stages. John Crow PNAS (1992) 89:5769-5773. cDNA clones from tomato displaying differential expression during fruit development have been isolated and characterized (Mansson et al., Mol. Gen. Genet. (1985) 200:356-361; Slater et al., Plant Mol. Biol. (1985) 5:137-147). These studies have focused

15 primarily on mRNAs which accumulate during fruit ripening. One of the proteins encoded-by the ripening-specific cDNAs has been identified as polygalacturonase (Slater et al., Plant Mol. Biol. (1985) 5:137-147). A cDNA clone which

20 encodes tomato polygalacturonase has been sequenced (Grierson et al., Nucleic Acids Research (1986) 14:8395-8603). Improvements in aspects of tomato fruit storage and handling through transcriptional manipulation of expression of the polygalacturonase gene have been reported (Sheehy et

25 al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85:8805-8809; Smith et al., Nature (1988) 334: 724-726).

Mature plastid mRNA for psbA (one of the components of photosystem II) reaches its highest level late in fruit development, whereas after the onset of ripening, plastid

mRNAs for other components of photosystem I and II decline to nondetectable levels in chromoplasts (Piechulla et al., *Plant Molec. Biol.* (1986) 7:367-376). Recently, cDNA clones representing genes apparently involved in tomato pollen (McCormick et al., *Tomato Biotechnology* (1987) Alan R. Liss,

Inc., NY) and pistil (Gasser et al., *Plant Cell* (1989), 1:15-24) interactions have also been isolated and characterized.

Other studies have focused on genes inducibly regulated, e.g. genes encoding serine proteinase inhibitors, which are expressed in response to wounding in tomato (Graham et al., *J. Biol. Chem.* (1985) 260:6555-6560; Graham et al., *J. Biol. Chem.* (1985) 260:6561-6554) and on mRNAs correlated with ethylene synthesis in ripening fruit and leaves after wounding (Smith et al., *Planta* (1986) 168: 94-100). Accumulation of a metallocarboxypeptidase inhibitor protein has been reported in leaves of wounded potato plants (Graham et al., *Biochem & BioPhys. Res Comm.* (1981) 101: 1164-1170).

Genes which are expressed preferentially in plant seed tissues, such as in embryos or seed coats, have also been reported. See, for example, European Patent Application 87306739.1 (published as 0 255 378 on February 3, 1988) and Kridl et al. (*Seed Science Research* (1991) 1:209-219).

Agrobacterium-mediated cotton transformation is described in Umbeck, United States Patents Nos. 5,004,863 and 5,159,135 and cotton transformation by particle bombardment is reported in WO 92/15675, published September

17, 1992. Transformation of *Brassica* has been described by Radke et al. (Theor. Appl. Genet. (1988) 75:685-694; Plant Cell Reports (1992) 11:499-505.

Transformation of cultivated tomato is described by
5 McCormick et al., *Plant Cell Reports* (1986) 5:81-89 and
Fillatti et al., *Bio/Technology* (1987) 5:726-730.

SUMMARY OF THE INVENTION

Novel DNA constructs and methods for their use are
10 described which are capable of directing transcription of a
gene of interest in ovary tissue, particularly early in
fruit development. The novel constructs include a vector
comprising a transcriptional and translational initiation
region obtainable from a gene expressed in ovary tissue and
15 methods of using constructs including the vector for
altering fruit phenotype. The fruit may be edible or non-
edible. The method includes transfecting a host plant cell
of interest with a transcription or expression cassette
comprising a promoter which is active in ovary cells prior
20 to, and during, the pollination stage of the fruit, then
generating a plant, which is grown to produce fruit having
the desired phenotype. Constructs and methods of the
subject invention thus find use in modulation of endogenous
fruit products, as well as production of exogenous products
25 and in modifying the phenotype of fruit and fruit products.
The constructs also find use as molecular probes. In
particular, constructs and methods for use in gene
expression in cotton embryo tissues are considered herein.

By these methods, novel cotton plants and cotton plant parts, such as modified cotton fibers, may be obtained.

Also provided in the instant application are constructs and methods of use relating to modification of color phenotype in plant tissues. Such constructs contain sequences for expression of genes involved in the production of colored compounds, such as melanin or indigo, and also contain sequences which provide for targeting of the gene products to particular locations in the plant cell, such as plastid organelles, or vacuoles. Plastid targeting is of particular interest for expression of genes involved in aromatic amino acid biosynthesis pathways, while vacuolar targeting is of particular interest where the precursors required in synthesis of the pigment are present in vacuoles. Production of melanin, for example, may be enhanced by vacuolar targeting in plant tissues which accumulate tyrosine in vacuoles. Transcriptional initiation regions for expression of color-related genes will be selected on the basis of the tissue for which color modification is desired.

DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows the DNA sequence of cDNA clone pZ130. The sequences corresponding to the pZ7 cDNA clone are underlined.

Figure 2 shows the sequence of the region of the Calgene Lambda 140 genomic clone that overlaps with the pZ130 cDNA clone (this region is underlined) and a partial sequence of regions 5' and 3' to that region. The start of

the pZ130 gene transcript is indicated by the underlined, boldfaced "A" at position 2567. An intron in the gene sequence is indicated by the lower case sequence from position 2702 through position 2921. Sites for common
5 restriction enzymes are indicated.

The symbols in the sequence have the following meaning:

A=adenosine; C=cytosine; G=guanine; T=thymidine or uracil; R=A or G; Y=C or T or U; M=C or A; K=T or U or G;
10 W=T or U or A; S=C or G; N=either C, T, A G or U; B=not A; D=not C; H=not G; V=not T or U.

Figure 3 shows a restriction map of Calgene Lambda
140. B:BamHI; G:*Bgl*III; H:*Hind*III; R:*Eco*RI; S:*Sal*I.

Figure 4 shows a complete DNA sequence of cDNA clone
15 pZ70. The sequences corresponding to the pZ8 cDNA clone are underlined. The start and end of the mature protein encoded by the pZ70 gene are also indicated.

Figure 5 shows a restriction map of Calgene Lambda
116. B:BamHI; G:*Bgl*III, H:*Hind*III; P:*Sph*I; R:*Eco*RI; S:*Sal*I;
20 X:*Xba*I.

Figure 6 shows the results of a Northern blot experiment illustrating a developmental time course of pZ7 and pZ8 RNA accumulation. The stages of UC82B fruit development (flowers and ovaries/fruit) are depicted above.
25 Numbers 1 through 21 represent days post flower opening.

Figure 7 shows a binary vector for plant transformation to express genes for melanin synthesis.

Figure 8 shows a linker region site map.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In accordance with the subject invention, novel constructs and methods for their use are described which may be used as molecular probes or inserted into a plant host to provide for transcription of a nucleotide sequence of interest in ovary cells as compared with other plant cells, generally preferentially in ovary cells to produce cells and plant parts having an altered phenotype. Of particular interest is the period of at least one to three days prior to anthesis through flower senescence.

The constructs include several forms, depending upon the intended use of the construct. Thus, the constructs include vectors, transcriptional cassettes, expression cassettes and plasmids. The transcriptional and translational initiation region (also sometimes referred to as a "promoter,"), preferably comprises a transcriptional initiation regulatory region and a translational initiation regulatory region of untranslated 5' sequences, "ribosome binding sites," responsible for binding mRNA to ribosomes and translational initiation. It is preferred that all of the transcriptional and translational functional elements of the initiation control region are derived from or obtainable from the same gene. In some embodiments, the promoter will be modified by the addition of sequences, such as enhancers, or deletions of nonessential and/or undesired sequences. By "obtainable" is intended a promoter having a DNA sequence sufficiently similar to that of a native promoter to provide for the desired specificity of transcription of a DNA sequence of interest. It includes

natural and synthetic sequences as well as sequences which may be a combination of synthetic and natural sequences.

The vectors typically comprise a nucleotide sequence of one or more nucleotides and a transcriptional initiation regulatory region associated with gene expression in ovary tissue. A transcriptional cassette for transcription of a nucleotide sequence of interest in ovary tissue will include in the direction of transcription, an ovary tissue transcriptional initiation region and optionally a translational initiation region, a DNA sequence of interest, and a transcriptional and optionally translational termination region functional in a plant cell. When the cassette provides for the transcription and translation of a DNA sequence of interest it is considered an expression cassette. One or more introns may be also be present.

Other sequences may also be present, including those encoding transit peptides and secretory leader sequences as desired. The regulatory regions are capable of directing transcription in ovary cells from anthesis through flowering but direct little or no expression after the initial changes which occur at the time surrounding pollination and/or fertilization; transcription from these regulatory regions is not detectable at about three weeks after anthesis. Further, ovary-tissue transcription initiation regions of this invention are typically not readily detectable in other plant tissues. Transcription initiation regions from ovary tissue that are not ovary specific may find special application. Especially preferred

are transcription initiation regions which are not found at stages of fruit development other than pre-anthesis through flowering. Transcription initiation regions capable of initiating transcription in other plant tissues and/or at
5 other stages of ovary development, in addition to the foregoing, are acceptable insofar as such regions provide a significant expression level in ovary tissue at the defined periods of interest and do not negatively interfere with the plant as a whole, and, in particular, do not interfere
10 with the development of fruit and/or fruit-related parts. Also of interest are ovary tissue promoters and/or promoter elements which are capable of directing transcription in specific ovary tissues such as outer pericarp tissue, inner core tissues, integuments, and the like.

15 Transcriptional initiation regions which are expressible in ovary tissue at or near maximal levels during the period of interest of this invention, generally the flowering period of plant reproductive cycles, are preferred. Of particular interest is the period of at least
20 one to three days prior to anthesis through flower senescence. The transcription level should be sufficient to provide an amount of RNA capable of resulting in a modified fruit. The term "fruit" as used herein refers to the mature organ formed as the result of the development of the ovary
25 wall of a flower and any other closely associated parts. See Weirer, T.E., 1, ed., *Botany A Introduction to Plant Biology* (6th ed.) (John Wiley & Sons, 1982); Tootill & Backmore, *The Facts on File Dictionary of Botany* (Market Home Books Ltd., 1984). By "modified fruit" is meant fruit

having a detectably different phenotype from a nontransformed plant of the same species, for example, one not having the transcriptional cassette in question in its genome.

- 5 Of particular interest are transcriptional initiation regions associated with genes expressed in ovary tissue and which are capable of directing transcription at least 24 hours prior to anthesis through flower senescence. The term "anthesis" refers herein to the period associated with
- 10 flower opening and flowering. The term "flower senescence" refers herein to the period associated with flower death, including the loss of the (flower) petals, etc.
- Abercrombie, M., et al., *A Dictionary of Biology* (6th ed) (Penguin Books, 1973). Unopened flowers, or buds, are
- 15 considered "pre-anthesis." Anthesis begins with the opening of the flower petals, which represents asexually receptive portion of the reproductive cycle of the plant. Typically, flowering lasts approximately one week in the tested UCB82 tomato variety. In a plant like cotton, flowering lasts
- 20 approximately two weeks and the fiber develops from the seed coat tissue. It is preferred that the transcriptional initiation regions of this invention do not initiate transcription for a significant time or to a significant degree prior to plant flower budding. Ideally, the level of
- 25 transcription will be high for at least approximately one to three days and encompass the onset of anthesis ("pre-anthesis").

It further is desired that the transcriptional initiation regions of this invention show a decreased level

of transcriptional activity within 1-3 days after the onset of anthesis which does not increase, and preferably decreases over time. Fertilization of a tomato embryo sac, to produce the zygote that forms the embryo plant, typically occurs 2-3 days after flower opening. This coincides with a decrease in the activity of a transcriptional initiation region of this invention. Thus, it is desired that the transcriptional activity of the promoter of this invention significantly decrease within about two days after the onset of anthesis. Transcriptional initiation regions of this invention will be capable of directing expression in ovary tissue at significant expression levels during the preferred periods described above.

15 In some embodiments, it will be desired to selectively regulate transcription in a particular ovary tissue or tissues. When used in conjunction with a 5' untranslated sequence capable of initiating translation, expression in defined ovary tissue, including ovary integuments (also known as "ovule epidermal cells"), core or pericarp tissue, and the like, the transcriptional initiation region can direct a desired message encoded by a DNA sequence of interest in a particular tissue to more efficiently effect a desired phenotypic modification. For example, expression 20 in ovary pericarp tissue, also known as the ovary wall and/or ovary core tissue, could result in useful modifications to the edible portions of many fruits, including true berries such as tomato, grape, blueberry, cranberry, currant, and eggplant; stone fruits (drupes), 25

such as cherry, plum, apricot, peach, nectarine and avocado; and compound fruits (druplets), such as raspberry and blackberry. In hesperidium (oranges, citrus), such expression cassettes are expected to be expressed in the

5 "juicy" portion of the fruit. In pepos, (such as watermelon, cantaloupe, honeydew, cucumber, and squash) the equivalent tissue is most likely the inner edible portions. In other fruits, such as legumes, the equivalent tissue is the seed pod.

10 The modification of analogous structures of non-edible fruit may also be of interest. Thus, of special interest are transcription initiation regions expressible in at least ovary outer pericarp tissue. For example, in cotton the analogous ovary structure is the burr of the cotton
15 boll, in rapeseed it is the seed pod. In a like manner, regulating expression in ovary integuments and/or core tissue may result in useful modifications to the analogous fruit and related structures evolving there from, for example seed coat hairs, such as cotton fibers. Cotton
20 fiber is a differentiated single epidermal cell of the outer integument of the ovule. It has four distinct growth phases; initiation, elongation (primary cell wall synthesis), secondary cell wall synthesis, and maturation. Initiation of fiber development appears to be triggered by
25 hormones. The primary cell wall is laid down during the elongation phase, lasting up to 25 days postanthesis (DPA). Synthesis of the secondary wall commences prior to the cessation of the elongation phase and continues to approximately 40 DPA, forming a wall of almost pure

cellulose. In addition to ovary tissue promoters, transcriptional initiation regions from genes expressed preferentially in seed tissues, and in particular seed coat tissues, are also of interest for applications where
5 modification of cotton fiber cells is considered.

An example of a gene which is expressed at high levels in *Brassica* seed coat cells is the EA9 gene described in EPA O 255 378. The nucleic acid sequence of a portion of the EA9 cDNA is provided therein, and can be used to obtain
10 corresponding sequences, including the promoter region. An additional seed gene which is expressed in seed embryo and seed coat cells is the *Bce4 Brassica* gene. The promoter region from this gene also finds use in the subject invention; this gene and the corresponding promoter region
15 are described in WO 91/13980, which was published September 19, 1991. Fiber specific proteins are developmentally regulated. Thus, transcriptional initiation regions from proteins expressed in fiber cells are also of interest. An example of a developmentally regulated fiber cell protein,
20 is E6 (John and Crow Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) (1992) 89:5769-5773). The E6 gene is most active in fiber, although low levels of transcripts are found in leaf, ovule and flower.

To obtain a specifically derived transcriptional
25 initiation region, the following steps may be employed. Messenger RNA (mRNA) is isolated from tissue of the desired developmental stage. This mRNA is then used to construct cDNA clones which correspond to the mRNA population both in terms of primary DNA sequence of the clones and in terms of

abundance of different clones in the population. mRNA is also isolated from tissue of a different developmental stage in which the target gene should not be expressed (alternate tissue). Radioactive cDNA from the desired
5 tissue and from the alternate tissue is used to screen duplicate copies of the cDNA clones. The preliminary screen allows for classification of the cDNA clones as those which correspond to mRNAs which are abundant in both tissues; those which correspond to mRNAs which are not abundant in
10 either tissue; those which correspond to mRNAs which are abundant in one tissue and relatively non-abundant in the other. Clones are then selected which correspond to mRNAs that are abundant only in the desired tissue and then these selected clones are further characterized.

15 Since the hybridization probe for the preliminary screen outlined above is total cDNA from a particular tissue, it hybridizes primarily to the most abundant sequences. In order to determine the actual level of expression, particularly in tissue where the mRNA is not as
20 abundant, the cloned sequence is used as a hybridization probe to the total mRNA population(s) of the desired tissue(s) and various undesired tissue(s). This is most commonly done as a Northern blot which gives information about both the relative abundance of the mRNA in particular
25 tissues and the size of the mRNA transcript.

It is important to know whether the abundance of the mRNA is due to transcription from a single gene or whether it is the product of transcription from a family of genes. This can be determined by probing a genomic Southern blot

with the cDNA clone. Total genomic DNA is digested with a variety of restriction enzymes and hybridized with the radioactive cDNA clone. From the pattern and intensity of the hybridization, one can distinguish between the possibilities that the mRNA is encoded either by one or two genes or by a large family of related genes. It can be difficult to determine which of several cross-hybridizing genes encodes the abundantly expressed mRNA found in the desired tissue. For example, tests indicate that pZ130 (see Example 4) is a member of a small gene family however, the pZ7 probe is capable of distinguishing pZ130 from the remainder of the family members.

The cDNA obtained as described can be sequenced to determine the open reading frame (probable protein coding region) and the direction of transcription so that a desired target DNA sequence later can be inserted at the correct site and in the correct orientation into a transcription cassette. Sequence information for the cDNA clone also facilitates characterization of corresponding genomic clones including mapping and subcloning as described below. At the same time, a genomic library can be screened for clones containing the complete gene sequence including the control region flanking the transcribed sequences. Genomic clones generally contain large segments of DNA (approximately 10-20 kb) and can be mapped using restriction enzymes, then subcloned and partially sequenced to determine which segments contain the developmentally regulated gene.

Using the restriction enzyme map and sequence information, plasmids can be designed and constructed which have the putative ovary gene or other desired promoter regions attached to genes which are to be expressed in ovary and/or other desired tissue, particularly ovary-derived tissue. These hybrid constructions are tested for their pattern of expression in transformed, regenerated plants to be sure that the desired timing and/or tissue expression and/or the overall level of expression has been maintained successfully when the promoter is no longer associated with the native open reading frame. Using the method described above, several transcriptional regulatory regions have been identified. One example is the tomato-derived transcriptional initiation region which regulates expression of the sequence corresponding to the pZ130 cDNA clone. Sequences hybridizable to the pZ130 clone, for example, probe pZ7, show abundant mRNA, especially at the early stages of anthesis. The message is expressed in ovary integument and ovary outer pericarp tissue and is not expressed, or at least is not readily detectable, in other tissues or at any other stage of fruit development. Thus, the pZ130 transcriptional initiation region is considered ovary-specific for purposes of this invention. Fig. 1 provides the DNA sequence of cDNA clone pZ130. The native function of the amino acid sequence encoded by the structural gene comprising pZ130 is unknown.

Downstream from, and under the regulatory control of, the ovary tissue transcriptional/translational initiation control region is a nucleotide sequence of interest which

provides for modification of the phenotype of structures maturing from ovary tissue, such as fruit or fiber. The nucleotide sequence may be any open reading frame encoding a polypeptide of interest, for example, an enzyme, or a sequence complementary to a genomic sequence, where the genomic sequence may be an open reading frame, an intron, a noncoding leader sequence, or any other sequence where the complementary sequence inhibits transcription, messenger RNA processing, for example, splicing, or translation. The nucleotide sequences of this invention may be synthetic, naturally derived, or combinations thereof. Depending upon the nature of the DNA sequence of interest, it may be desirable to synthesize the sequence with plant preferred codons. The plant preferred codons may be determined from the codons of highest frequency in the proteins expressed in the largest amount in the particular plant species of interest. Phenotypic modification can be achieved by modulating production either of an endogenous transcription or translation product, for example as to the amount, relative distribution, or the like, or an exogenous transcription or translation product, for example to provide for a novel function or products in a transgenic host cell or tissue. Of particular interest are DNA sequences encoding expression products associated with the development of plant fruit, including genes involved in metabolism of cytokinins, auxins, ethylene, abscissic acid, and the like. Methods and compositions for modulating cytokinin expression are described in United States Patent No. 5,177,307, which disclosure is hereby incorporated by

reference. Alternatively, various genes, from sources including other eukaryotic or prokaryotic cells, including bacteria, such as those from *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA auxin and cytokinin biosynthetic gene products, for example, and mammals, for example interferons, may be used.

Other phenotypic modifications include modification of the color of plant parts developing from ovary integuments and/or core tissue, for example seed coat hairs, such as cotton fibers. Of interest are genes involved in production of melanin and genes involved in the production of indigo. Melanins are dark brown pigments found in animals, plants and microorganisms, any of which may serve as a source for sequences for insertion into the constructs of the present invention. Specific examples include the tyrosinase gene which can be cloned from *Streptomyces antibioticus*. The ORF438 encoded protein in *S. antibioticus* also is necessary for melanin production, and may provide a copper donor function. In addition, a tyrosinase gene can be isolated from any organism which makes melanin. The gene can be isolated from human hair, melanocytes or melanomas, cuttle fish and red roosters, among others. See, for example, EP Application No. 89118346.9 which discloses a process for producing melanins, their precursors and derivatives in microorganisms. Also, See, Bernan et al. *Gene* (1985) 37:101-110; and della-Cioppa et al. *Bio/Technology* (1990) 8:634-638.

Indigo may be obtained by use of genes encoding a mono-oxygenase such as xylene oxygenase which oxidizes toluene and xylene to (methyl) benzyl alcohol and also

transforms indole to indigo. Cloning of the xylene oxygenase gene and the nucleotide and amino acid sequences are described in unexamined Japanese Patent Application Kokai:2-119777, published May 7, 1990. A dioxygenase such
5 as naphthalene dioxygenase which also converts indole to indigo finds use; the naphthalene dioxygenase gene nahA is described in Science (1983) 222: 167. For cloning, nucleotide sequence in characterization of genes encoding naphthalene dioxygenase of *Pseudomonas putida*. See, Kurkela
10 et al. Gene (1988) 73:355-362. A tryptophanase gene sequence can be used in conjunction with an oxygenase to increase the amount of indole available for conversion to indigo. Sources of tryptophanase gene sequences include *E. coli* (see, for example, Deeley et al. (1982) *J. Bacteriol.*
15 151 :942-951).

As demonstrated in the following examples, expression of ORF438 and tyrosinase genes from *Streptomyces* in transgenic tobacco plants using a pZ7 promoter, and targeting the gene products to plastids by the action of
20 transit peptides resulted in phenotypic modification of tissues ovary and meristem derived tissues, including modification of color in meristematic regions and basal flower buds. A similar set of experiments in which no plastid targeting sequences were used in conjunction with
25 the ORF438 and tyrosinase genes, no alteration of phenotype was observed. Presumably, the plants were not able to produce melanin due to deficiency of the required substrates in the plant cell cytosol. Plastid targeting sequences (transit peptides) are available from a number of

plant nuclear-encoded plastid proteins, such as the small subunit (SSU) of ribulose biphosphate carboxylase, plant fatty acid biosynthesis related genes including acyl carrier protein (ACP), stearyl-ACP desaturase, β -ketoacyl-ACP synthase and acyl-ACP thioesterase, or LHCPII genes.

The encoding sequence for a transit peptide which provides for transport to plastids may include all or a portion of the encoding sequence for a particular transit peptide, and may also contain portions of the mature protein encoding sequence associated with a particular transit peptide.

There are numerous examples in the art of transit peptides which may be used to deliver a target protein into a plastid organelle. The particular transit peptide encoding sequence used in the instant invention is not critical, as long as delivery to the plastid is obtained.

As an alternative to using transit peptides to target pigment synthesis proteins to plastid organelles, the desired constructs may be used to transform the plastid genome directly. In this instance, promoters capable of providing for transcription of genes in plant plastids are desired. Of particular interest is the use of a T7 promoter to provide for high levels of transcription.

Since plastids do not contain an appropriate polymerase for transcription from the T7 promoter, T7 polymerase may be expressed from a nuclear construct and targeted to plastids using transit peptides as described above. (See McBride et al. (1994) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91:7301-7305; see also copending US patent application entitled "Controlled Expression of Transgenic Constructs in Plant Plastids",

serial no. _____ filed June 6, 1995, and copending US patent application SN 08/167,638, filed December 14, 1993 and PCT/US94/14574 filed December 12, 1994.) Tissue specific or developmentally regulated promoters may be
5 useful for expression of the T7 polymerase in order to limit expression to the appropriate tissue or stage of development. For example, for flower color modification, the T7 polymerase may be expressed from a petal specific promoter to limit effects to the desired tissue.

10 Targeting of melanin synthesis genes to vacuoles is also of interest in plant tissues which accumulate the tyrosine substrate involved in melanin synthesis in vacuoles. The protein signal for targeting to vacuoles may be provided from a plant gene which is normally transported
15 across the rough endoplasmic reticulum, such as the 32 amino acid N-terminal region of the metallocarboxypeptidase inhibitor gene from tomato (Martineau *et al.* (1991) *Mol. Gen. Genet.* 228 :281-286). In addition to the signal sequence, vacuolar targeting constructs also encode a
20 vacuolar localization signal (VLS) positioned at the carboxy terminus of the encoded protein. Appropriate signal sequences and VLS regions may be obtained from various other plant genes and may be similarly used in the constructs of this invention. Numerous vacuolar targetting
25 peptides are known to the art, as are reviewed in Chrispeels *et al.*, *Cell* (1992) 68:613-616.

Thus, it is recognized that constructs of the instant invention which provide sequences encoding genes involved in color production and sequences which provide for

targeting of the gene products to appropriate cellular locations have broad application to modification of color in various plant tissues. Plant transcriptional initiation regions for use with these color modification constructs

5 will depend upon the particular plant tissue to be modified. For cotton fiber modification, for example, cotton fiber specific promoters or the pZ7 promoter described herein may find use. Additional cotton fiber promoters which may find use in the methods of the instant

10 application are described in copending US patent application to Pear *et al.*, entitled "Cotton Fiber Transcriptional Factors", serial no. _____, filed on June 7, 1995. For flower color modification, promoters from genes preferentially expressed in flowers,

15 and particularly in flower petals, are of interest. Examples of promoters useful for expression in flowers include chalcone synthase, as described in Holton *et al.* (1994) TIBTECH, Vol 12, pages 40-42 (see also Napoli *et al.* (1990) Plant Cell, Vol 2, pages 79-89; Lipphardt *et al.*, 20 (1988) EMBO, 7(13) pages 4027-4034; and Toguri *et al.*, (1993) Plant Mol Biol, Vol 23, pages 933-946.

Also of interest are genes involved in production of colored pigments in plant tissues, such as the Maize A1 gene which encodes a dihydroflavonol reductase, an enzyme

25 of the anthocyanin pigmentation pathway. In cells that express the A1 gene, dihydrokempferol is converted to 2-8 alkylleucopelargonidin, which may be further metabolized to pelargonidin pigment by endogenous plant enzymes. Other anthocyanin or flavonoid type pigments may also be of

interest for modification of cotton cell fibers, plant flowers or other plant tissues. For a review of plant flower color, see van Tunen et al. (in Plant Biotechnology Series, Volume 2 (1990) Developmental Regulation of Plant Gene Expression, D. Grierson ed.).

Although cotton fibers in commercially grown varieties are primarily white in color, other naturally occurring cotton varieties have brown or reddish-brown fibers. Also a cotton line containing green colored fibers has been identified. The existence of these colored cotton lines suggests that the precursors required for the anthocyanin pigment pathways are present in cotton fibers cells, thus allowing further color phenotype modifications.

For some applications, it is of interest to modify other aspects of structures developing from the ovary integument and related structures. For example, it is of interest to modify various aspects of cotton fibers, such as strength or texture of a fiber. Thus, the appropriate gene may be inserted in the constructs of the invention, including genes for PHB biosynthesis (see, Peoples et al. *J. Biol. Chem.* (1989) 264: 15298-15303 and *Ibid.* 15293-15397; Saxena, *Plant Molecular Biology* (1990) 15:673-683, which discloses cloning and sequencing of the cellulose synthase catalytic subunit gene; and Bowen et al. *PNAS* (1992) 89:519-523 which discloses chitin synthase genes of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*.

Transcriptional cassettes may be used when the transcription of an anti-sense sequence is desired. When the expression of a polypeptide is desired, expression

cassettes providing for transcription and translation of the DNA sequence of interest will be used. Various changes are of interest; these changes may include modulation (increase or decrease) of formation of particular
5 saccharides, hormones, enzymes, or other biological parameters. These also include modifying the composition of the final fruit or fiber, that is changing the ratio and/or amounts of water, solids, fiber or sugars. Other phenotypic properties of interest for modification include response to
10 stress, organisms, herbicides, brushing, growth regulators, and the like. These results can be achieved by providing for reduction of expression of one or more endogenous products, particularly an enzyme or cofactor, either by producing a transcription product which is complementary
15 (anti-sense) to the transcription product of a native gene, so as to inhibit the maturation and/or expression of the transcription product, or by providing for expression of a gene, either endogenous or exogenous, to be associated with the development of a plant fruit.

20 The termination region which is employed in the expression cassette will be primarily one of convenience, since the termination regions appear to be relatively interchangeable. The termination region may be native with the transcriptional initiation region, may be native with
25 the DNA sequence of interest, may be derived from another source. The termination region may be naturally occurring, or wholly or partially synthetic. Convenient termination regions are available from the Ti-plasmid of *A. tumefaciens*, such as the octopine synthase and nopaline

synthase termination regions. In some embodiments, it may be desired to use the 3' termination region native to the ovary tissue transcription initiation region used in a particular construct.

5 As described herein, in some instances additional nucleotide sequences will be present in the constructs to provide for targeting of a particular gene product to specific cellular locations. For example, where coding sequences for synthesis of aromatic colored pigments are
10 used in a construct, particularly coding sequences for enzymes which have as their substrates aromatic compounds such as tyrosine and indole, it is preferable to include sequences which provide for delivery of the enzyme into plastids, such as an SSU transit peptide sequence. Also,
15 for synthesis of pigments derived from tyrosine, such as melanin, targeting to the vacuole may provide for enhanced color modifications.

For melanin production, the tyrosinase and ORF438 genes from *Streptomyces antibioticus* (Berman et al. (1985)
20 37:101-110) are provided in cotton fiber cells for expression from a pZ130 promoter. In *Streptomyces*, the ORF438 and tyrosinase proteins are expressed from the same promoter region. For expression from constructs in a transgenic plant genome, the coding regions may be provided
25 under the regulatory control of separate promoter regions. The promoter regions may be the same or different for the two genes. Alternatively, coordinate expression of the two genes from a single plant promoter may be desired. Constructs for expression of the tyrosinase and ORF438 gene

products from pZ130 promoter regions are described in detail in the following examples. Additional promoters may also be desired, for example plant viral promoters, such as CaMV 35S, can be used for constitutive expression of one of the desired gene products, with the other gene product being expressed in cotton fiber tissues from the pZ130 promoter. In addition, the use of other plant promoters for expression of genes in cotton fibers is also considered, such as the *Brassica* seed promoters and the E6 gene promoter discussed above. Similarly, other constitutive promoters may also be useful in certain applications, for example the mas, Mac or DoubleMac, promoters described in United States Patent No. 5,106,739 and by Comai et al., *Plant Mol. Biol.* (1990) 15:373-381).

When plants comprising multiple gene constructs are desired, for example plants expressing the melanin genes, ORF438 and tyrosinase, the plants may be obtained by co-transformation with both constructs, or by transformation with individual constructs followed by plant breeding methods to obtain plants expressing both of the desired genes.

The various constructs normally will be joined to a marker for selection in plant cells. Conveniently, the marker may be resistance to a biocide, particularly an antibiotic, such as kanamycin, G418, bleomycin, hygromycin, chloramphenicol, or the like. The particular marker employed will be one which will allow for selection of transformed cells as compared to cells lacking the DNA which has been introduced. Components of DNA constructs

including transcription cassettes of this invention may be prepared from sequences which are native (endogenous) or foreign (exogenous) to the host. By foreign is intended that the sequence is not found in the wild-type host into which the construct is introduced. Heterologous constructs will contain at least one region which is not native to the gene from which the ovary tissue transcription initiation region is derived.

In preparing the constructs, the various DNA fragments may be manipulated, so as to provide for DNA sequences in the proper orientation and, as appropriate, in proper reading frame for expression; adapters or linkers may be employed for joining the DNA fragments or other manipulations may be involved to provide for convenient restriction sites, removal of superfluous DNA, removal of restriction sites, or the like. *In vitro* mutagenesis, primer repair, restriction, annealing, resection, ligation, or the like may be employed, where insertions, deletions or substitutions, e.g. transitions and transversions, may be involved. Conveniently, a vector or cassette may include a multiple cloning site downstream from the ovary-related transcription initiation region, so that the construct may be employed for a variety of sequences in an efficient manner.

In carrying out the various steps, cloning is employed, so as to amplify the amount of DNA and to allow for analyzing the DNA to ensure that the operations have occurred in proper manner. By appropriate manipulations, such as restriction, chewing back or filling in overhangs

to provide blunt ends, ligation of linkers, or the like, complementary ends of the fragments can be provided for joining and ligation. A wide variety of cloning vectors are available, where the cloning vector includes a replication system functional in *E. coli* and a marker which allows for selection of the transformed cell. Illustrative vectors include pBR332, pUC series, M13mp series, pACYC184, etc. Thus, the sequence may be inserted into the vector at an appropriate restriction site(s), the resulting plasmid used to transform the *E. coli* host, the *E. coli* grown in an appropriate nutrient medium and the cells harvested and lysed and the plasmid recovered. Analysis may involve sequence analysis, restriction analysis, electrophoresis, or the like. After each manipulation the DNA sequence to be used in the final construct may be restricted and joined to the next sequence. Each of the partial constructs may be cloned in the same or different plasmids.

A variety of techniques are available and known to those skilled in the art for introduction of constructs into a plant cell host. These techniques include transfection with DNA employing *A. tumefaciens* or *A. rhizogenes* as the transfecting agent, protoplast fusion, injection, electroporation, particle acceleration, etc. For transformation with *Agrobacterium*, plasmids can be prepared in *E. coli* which contain DNA homologous with the Ti-plasmid, particularly T-DNA. The plasmid may or may not be capable of replication in *Agrobacterium*, that is, it may or may not have a broad spectrum prokaryotic replication system such as does, for example, pRK290, depending in part

upon whether the transcription cassette is to be integrated into the Ti-plasmid or to be retained on an independent plasmid. The *Agrobacterium* host will contain a plasmid having the *vir* genes necessary for transfer of the T-DNA to the plant cell and may or may not have the complete TDNA. At least the right border and frequently both the right and left borders of the T-DNA of the Ti- or Ri-plasmids will be joined as flanking regions to the transcription construct. The use of T-DNA for transformation of plant cells has received extensive study and is amply described in EPA Serial No. 120,516, Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offset-drukkerij Kanthers B.V., Alblasterdam, 1985, Chapter V, Knauf, et al., Genetic Analysis of Host Range Expression by *Agrobacterium*, In: Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction, Puhler, A. ed., Springer-Verlag, NY, 1983, p. 245, and An, et al., *EMBO J.* (1985) 4:277-284.

For infection, particle acceleration and electroporation, a disarmed Ti-plasmid lacking particularly the tumor genes found in the T-DNA region) may be introduced into the plant cell. By means of a helper plasmid, the construct may be transferred to the *A. tumefaciens* and the resulting transfected organism used for transfecting a plant cell; explants may be cultivated with transformed *A. tumefaciens* or *A. rhizogenes* to allow for transfer of the transcription cassette to the plant cells. Alternatively, to enhance integration into the plant genome, terminal repeats of transposons may be used as borders in conjunction with a transposase. In this

situation, expression of the transposase should be inducible, so that once the transcription construct is integrated into the genome, it should be relatively stably integrated. Transgenic plant cells are then placed in an appropriate selective medium for selection of transgenic cells which are then grown to callus, shoots grown and plantlets generated from the shoot by growing in rooting medium.

To confirm the presence of the transgenes in transgenic cells and plants, a Southern blot analysis can be performed using methods known to those skilled in the art. Expression products of the transgenes can be detected in any of a variety of ways, depending upon the nature of the product, and include immune assay, enzyme assay or visual inspection, for example to detect pigment formation in the appropriate plant part or cells. Once transgenic plants have been obtained, they may be grown to produce fruit having the desired phenotype. The fruit or fruit parts, such as cotton fibers may be harvested, and/or the seed collected. The seed may serve as a source for growing additional plants having the desired characteristics. The terms transgenic plants and transgenic cells include plants and cells derived from either transgenic plants or transgenic cells.

The various sequences provided herein may be used as molecular probes for the isolation of other sequences which may be useful in the present invention, for example, to obtain related transcriptional initiation regions from the same or different plant sources. Related transcriptional

initiation regions obtainable from the sequences provided in this invention will show at least about 60% homology, and more preferred regions will demonstrate an even greater percentage of homology with the probes. Of particular importance is the ability to obtain related transcription initiation control regions having the timing and tissue parameters described herein. For example, using the probe pZ130, at least 7 additional clones, have been identified, but not further characterized. Thus, by employing the techniques described in this application, and other techniques known in the art (such as Maniatis, et al., *Molecular Cloning, - A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, New York) 1982), other transcription initiation regions capable of directing ovary tissue transcription as described in this invention may be determined. The constructs can also be used in conjunction with plant regeneration systems to obtain plant cells and plants; the constructs may also be used to modify the phenotype of a fruit and fruits produced thereby.

For flower color modification, transformation of various flowering plant species is desired, including transformation of carnations, roses, gerberas, lilies, orchids, petunias and chrysanthemums. For cotton applications, various varieties and lines of cotton may find use in the described methods. Cultivated cotton species include *Gossypium hirsutum* and *G. babadense* (extra-long staple, or Pima cotton), which evolved in the New World, and the Old World crops *G. herbaceum* and *G.*

arboreum. The following examples are offered by way of illustration and not by limitation.

EXPERIMENTAL

5 The following deposits have been made at the American Type Culture Collection (ATCC) (12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852). Bacteriophage Calgene Lambda 116 and Calgene Lambda 140, each containing a transcription initiation region of this invention, were deposited on July 10 13, 1989 and were given accession numbers 40632 and 40631, respectively.

Example 1

15 Construction of Pre-Anthesis Tomato Ovary cDNA Banks and Screening for Ovary-Specific Clones

cDNA Library Preparation

Tomato plants (*Lycopersicon esculentum* cv UC82B) were grown under greenhouse conditions. Poly(A)+ RNA was 20 isolated as described by Mansson et al., *Mol. Gen. Genet.* (1985) 200:356-361. The synthesis of cDNA from poly(A)+ RNA, prepared from ovaries of unopened tomato flowers (pre-anthesis stage), was carried out using the BRL cDNA Cloning Kit following the manufacturer's instructions (BRL; 25 Bethesda, MD). Addition of restriction endonuclease EcoRI linkers (1078, New England Biolabs; Beverly, MA) to the resulting double-stranded cDNA was accomplished by using the procedures described in Chapter 2 of *DNA Cloning Vol. I: A Practical Approach*, Glover, ed., (BRL Press, Oxford 30 1985). Cloning the cDNA into the EcoRI site of the phage

Lambda ZAP (Stratagene; La Jolla, CA) and packaging the resulting recombinant phage (using GigaPack Gold, Stratagene) was carried out as described in the respective commercial protocols.

- 5 Two cDNA libraries were prepared as described above from the same pre-anthesis stage mRNA. For the second library, which contained significantly longer cDNA than the first, the poly(A)+ RNA sample was run through an RNA spin column (Boehringer Mannheim Biochemicals; Indianapolis, IN), following the manufacturer's directions, prior to the cloning procedures.

cDNA Library Screening

- The first cDNA library was screened by differential hybridization using ^{32}P -labeled cDNA probes made from pre-anthesis mRNA, leaf mRNA and young seedling mRNA. Clones were selected based on hybridization to only pre-anthesis mRNA. The cDNAs corresponding to the selected Lambda ZAP (Stratagene) clones were excised from the phage vector and propagated as plasmids (following the manufacturer's instructions).

- From an initial screen of 1000 cDNAs, 30 selected clones falling into five classes based on the sequences of their cDNA inserts were isolated. Two clones, clones pZ7 and pZ8, were selected for further study. The DNA sequences of pZ7 and pZ8 are shown as the underlined portions of Figures 1 and 4, respectively.

Several thousand recombinant clones from the second cDNA library were screened by plaque hybridization (as described in the Stratagene Cloning Kit Instruction Manual)

with a mixture of radiolabeled DNA probes. Screening of approximately three thousand recombinant clones from the second library with the pZ7 and pZ8 DNA probes yielded selection of fourteen clones which had intense hybridization signals. The clones selected were excised from the phage vector and propagated as plasmids. DNA was isolated from each clone, cut with the restriction endonuclease *EcoRI*, then electrophoresed through a 0.7% agarose gel. Duplicate blot hybridizations were performed as described in Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, New York, 1982) with radiolabeled probes representing the genes of interest (pZ7 and pZ8). Seven clones which hybridized to pZ7 and three clones which hybridized to pZ8 were selected. The longest of these for each probe, pZ130 (pZ7-hybridizing) and pZ70 (pZ8-hybridizing), were characterized further and used in additional experiments.

Example 2

20 Analysis of cDNA Clones

Northern Analysis

Tissue-specificity of the cDNA clones was demonstrated as follows: RNA was isolated from 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 17 and 21 day post-anthesis, anthesis and pre-anthesis stage tomato ovaries, tomato leaves and unorganized tomato callus using the method of Ecker and Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:5203 (1987) with the following modifications. After the first precipitation of the nucleic

acid, the pellets were resuspended in 2 ml of diethylpyrocarbonate (DEP)treated water on ice. The solutions were brought to 1 mM MgCl₂ and 1/4 volume of 8 M LiCl was added. The samples were mixed well and stored at 4°C overnight. The samples were then centrifuged at 8,000 RPM for 20 min. at 4°C. The pellets were dried, resuspended in DEP-treated water on ice as before and ethanol-precipitated once more. The RNAs were electrophoresed on formaldehyde/agarose gels according to the method described by Fourney et al., *Focus* (1988) 10:5-7, immobilized on Nytran membranes (Schleicher & Schuell; Keene, NH) and hybridized with ³²P-labeled probes.

Based upon the Northern analysis with a ³²P-labeled pZ7 EcoRI insert DNA or a pZ8 EcoRI insert DNA, it is clear that both of these genes are most highly expressed at anthesis in tomato variety UC82B and somewhat less highly expressed prior to and a day following the opening of the flower. Figure 6 shows tomato flowers at various stages of development and immediately below, a representative ovary dissected from a flower at the same stage of development. As seen in Figure 6, by two days after the onset of anthesis, the expression of both genes had dropped off dramatically. The size of the mRNA species hybridizing to the pZ7 probe was approximately 800 nt and to the pZ8 probe approximately 500 nt.

From two days post-anthesis, pZ8 RNA accumulation was apparently maintained at a relatively low level while pZ7 RNA accumulation continued to drop off steadily until, by three weeks post-anthesis, it was undetectable by this

analysis. pZ8 RNA accumulation was not detectable by the method described above in RNA samples isolated from tomato fruit older than the immature green stage of fruit ripening. No RNA hybridizing to pZ7 or pZ8 was found in 5 callus tissue; no RNA hybridizing to pZ7 was found in leaf tissue; on longer exposures a barely detectable hybridization signal for pZ8 was seen in leaf RNA.

Expression Level

Message abundance corresponding to the cDNA probes was 10 determined by comparing the hybridization intensity of a known amount of RNA synthesized *in vitro* from the clones (using T7 or T3 RNA polymerase in the Riboprobe System (Promega)) to RNA from anthesis stage and three week old tomato ovaries. This analysis indicated that pZ7 and pZ8 15 cDNAs represent abundant RNA classes in anthesis-stage tomato ovaries, being approximately 5% and 2% of the message, respectively.

Cellular Specificity

The cellular specificity of the cDNA probes may be 20 demonstrated using the technique of *in situ* hybridization. Pre-anthesis stage UC82B tomato ovaries were fixed overnight in a 4% paraformaldehyde, phosphate buffered saline (PBS), 5 mM MgCl₂ solution, pH 7.4 (PBS is 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl) (Singer et al., 25 *Biotechniques* (1986) 4:230-250). After fixation, the tissue was passed through a graded tertiary butyl alcohol (TBA) series, starting at 50% alcohol, infiltrated with Paraplast and cast into paraffin blocks for sectioning (Berlyn and Miksche, *Botanical Microtechnique and Cytochemistry*, (1976)

Iowa). Embedded ovaries were transversely cut, 8 μ m thick sections, on a Reichert Histostat rotary microtome. Paraffin ribbons holding 5-7 ovary sections were affixed to gelatin-chrom alum subbed slides (Berlyn and Miksche (1976) *supra*) and held in a dust-free box until *in situ* hybridizations were performed. Slides ready to be hybridized were deparaffinized in xylene and rehydrated by passing through an ethanol hydration series as described in Singer et al., *supra* (1986).

- 10 A 2X hybridization mix was made consisting of 100 μ l 20X SSC, 20 μ l 10% BSA, 100 μ l 750 mM DTT, 200 μ l 50% dextran sulfate, 50 μ l RNasin, and 30 μ l sterile water. Sense and antisense 35 S-RNA probes were generated from cDNAs of interest using T3 and T7 RNA polymerases *in vitro* transcription (Riboprobe Promega Biotec or Stratagene) reactions following the manufacturer's protocol. 2.5 μ l tRNA (20 mg/ml), 2.5 μ l salmon sperm DNA (10 mg per ml) and 4 x 10⁶ cpm/ probe were dried down using a lyophilizer. This mix was then resuspended in 25 μ l 90% formamide containing 25 μ l 2X hybridization mix per slide. 40 μ l of this hybridization mix was placed on each slide. A cover slip was placed over the sections and edges sealed with rubber cement. Slides were placed in slide holders inside a glass slide box, covered, and placed in a 37°C dry oven overnight to hybridize. Posthybridization treatments were as described in Singer et al., (1986), *supra*.
- 15
20
25

Autoradiography was performed as described in KODAK *Materials for Light Microscope* (KODAK (1986); Rochester, NY) using liquid emulsion NTB-3. Slides are left to expose

in a light-tight box for approximately two weeks. After developing the autoradiographic slides, sections were stained in 0.05% toluidine blue and then dehydrated through a graded alcohol series; xylene:100% ethanol, 1:1, followed by 2 changes of 100% xylene, five minutes in each solution. Coverslips were mounted with Cytoseal (VWR; San Francisco, CA) and left on a slide warmer until dry (45-50°C, 1-2 days). Autoradiographic slides were then ready for microscopic examination.

When pre-anthesis tomato ovaries were hybridized to sense and antisense 35S-pZ7 RNA, the antisense transcripts hybridized specifically to the outer pericarp region of the ovary and to the outer region of the ovules (the integuments). The sense transcripts (negative control) showed no hybridization. When pre-anthesis tomato ovaries were hybridized to sense and antisense 35S-pZ8 RNA, the antisense transcript hybridized specifically to the inner core region of the ovary and to the outer region of the ovules. The sense transcripts showed no hybridization.

In summary, the mRNA transcripts encoded by the genes corresponding to pZ7 and pZ8 were abundantly expressed during a very specific stage of tomato fruit development, primarily at anthesis and at a day prior to and after the opening of the flower. The transcripts additionally were expressed in a specific subset of tomato ovary cell types during that stage of development particularly in the integuments (pZ7 and pZ8) as well as the ovarian outer pericarp (pZ7) and inner core region (pZ8).

Example 3Sequencing of pZ130 and pZ70 cDNA Clones

The complete DNA sequences of the cDNA pZ130 and pZ70 clones were determined using the Sanger et al. (1971) dideoxy technique. The DNA sequences of both pZ130 and pZ70 were translated in three frames. The sequences, including the longest open reading frame for each, are shown in Fig. 1 (pZ130) and Fig. 4 (pZ70).

Example 4Analysis of Gene Family

Southern analysis was performed as described by Maniatis et al., *supra*, (1982). Total tomato DNA from cultivar UC82B was digested with BamHI, EcoRI and HindIII, separated by agarose gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose. Southern hybridization was performed using ³²P-labeled probes produced by random priming of pZ130 or pZ70. A simple hybridization pattern indicated that the genes encoding pZ130 and pZ70 are present in a few or perhaps only one copy in the tomato genome.

Additional analysis, using a pZ130 hybridization probe to hybridize to tomato genomic DNA digested with the restriction endonuclease BglII, indicated that this gene is actually a member of a small (approximately 5-7 member) family of genes. The original pZ7 cDNA clone, consisting of sequences restricted to the 3'untranslated region of the longer pZ130 clone, however, hybridizes intensely only to one band and perhaps faintly to a second band based on Southern analysis using BglII digested tomato genomic DNA.

Example 5Preparation of Genomic Clones pZ130 and pZ70

Two genomic clones, one representing each of cDNA
5 clones pZ130 and pZ70, were obtained as follows. A genomic
library constructed from DNA of the tomato cultivar UC82B,
partially digested with the restriction endonuclease Sau3A,
was established in the lambda phage vector, lambda-FIX
according to the manufacturer's instructions (Stratagene;
10 La Jolla, CA). This library was screened using ³²P-labeled
pZ130 and pZ70 as probes. A genomic clone containing
approximately 14.5 kb of sequence from the tomato genome
which hybridized to pZ70 was isolated. The region which
hybridizes to the pZ70 probe was found within the
15 approximately 2 kb XbaI-HindIII restriction fragment of
Calgene Lambda 116 (See Figure 5). A second genomic clone,
containing approximately 13 kb of sequence from the tomato
genome and hybridizing to pZ130 (and pZ7) was isolated. The
region which hybridized to the pZ130 probe was found within
20 the larger EcoRI-HindIII restriction fragment of Calgene
Lambda 140 (See Figure 3).

Preparation of pCGN2015

pCGN2015 was prepared by digesting pCGN565 with *HhaI*,
blunting with mung bean nuclease, and inserting the
25 resulting fragment into an EcoRV digested BluescriptKSM13-
(Stratagene) vector to create pCGN2008. pCGN2008 was
digested with *EcoRI* and *HindIII*, blunted with Klenow, and
the 1156 bp chloramphenicol fragment isolated.
BluescriptKSM13+ (Stratagene) was digested with *DraI* and

the 2273 bp fragment isolated and ligated with the pCGN2008 chloramphenicol fragment creating pCGN2015.

Preparation of pCGN2901/pCGN2902

pCGN2901 contains the region surrounding the pZ7-
5 hybridizing region of the pZ130 genomic clone, including
approximately 1.8 kb in the 5' direction and approximately
4 kb in the 3'-direction. To prepare pCGN2901, Calgene
Lambda 140 was digested with *SalI* and the resulting
fragment which contains the pZ7-hybridizing region was
10 inserted into pCGN2015, at the pCGN2015 unique *SalI* site,
to create pCGN2901.

pCGN2902 contains the other *SalI* fragment (non-pZ7-
hybridizing) of the pZ130 genome derived from *SalI*
digestion of Calgene Lambda 140, also put into a pCGN2015
15 construct.

Example 6

20 Preparation of a pZ130 Expression Construct

Plasmid DNA isolated from pCGN2901 was digested to
completion with *NcoI* and then treated with exonuclease
isolated from mung bean (Promega, Madison, WI) to eliminate
single-stranded DNA sequences including the ATG sequence
25 making up a portion of the *NcoI* recognition sequence. The
sample was then digested to completion with *SacI*. The
resulting 1.8 kb (approximate) 5' *SacI* to *NcoI* fragment was
then inserted into a pUC-derived ampicillin-resistant
plasmid, pCGP261 (described below), that had been prepared

as follows. pCGP261 was digested to completion with *XbaI*, the single-stranded DNA sequences were filled in by treatment with the Klenow fragment of DNA polymerase I, and the pCGP261 DNA redigested with *SacI*. The resulting
5 expression construct contained, in the 5' to 3' direction of transcription, an ovary tissue promoter derived from Lambda 140, a *tmr* gene and *tmr* 3'-transcriptional termination region.

The plasmid pCGP261 contains the sequences from
10 position 8,762 through 9,836 from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTil5955 (as sequenced by Barker et al., *Plant Molec. Biol.* (1983) 2:335-350). This region contains the entire coding region for the genetic locus designated *tmr* which encodes isopentenyltransferase
15 (Akiyoshi et al., *PNAS* (1984) 81:4776-4780), 8 bp 5' of the translation initiation ATG codon and 341 bp of sequences 3' to the translation stop TAG codon.

Plasmid pCGP261 was created as follows. Plasmid pCGN1278 (described in co-pending application United States
20 Serial No. 382,176, filed July 19, 1989, which is hereby incorporated in its entirety by reference) was digested with *XbaI* and *EcoRI*. The single-stranded DNA sequences produced were filled in by treatment with the Klenow fragment of DNA polymerase I. The *XbaI* to *EcoRI* fragment
25 containing the *tmr* gene was then ligated into the vector ml3 Bluescript minus (Stratagene Inc., La Jolla, CA) at the *SmaI* site, resulting in plasmid pCGP259. All of the region found upstream of the ATG translation initiation codon and some of the *tmr* gene coding region was eliminated by

digesting pCGP259 with *Bsp*MI and *Bst*XI. The resulting coding region and 8 bp of the sequence originally found upstream of the first ATG codon was re-introduced into the plasmid and an *Xba*I site introduced into the plasmid via a synthetic oligonucleotide comprising the following sequence: 5' AATTAGATGCAGGTCCATAAGTTTTTCTAGACGCG 3'. The resulting plasmid is pCGP261. An *Xba*I to *Kpn*I fragment of pCGP261 containing the pZ130 gene 5' and *tmr* gene coding and 3' region construct was then inserted into a binary cassette such as pCGN1557 and transgenic plants prepared. (See co-pending application United States Serial No. 382,176 described above).

Example 7

Preparation of pZ130 Promoter Cassette

The pZ130 cassette contains 1.8 kb (pCGN2909) or 5 kb (pCGN2928) of DNA 5' of the translational start site and the 3' region (from the TAA stop codon to a site 1.2 kb downstream) of the pZ130 gene. The pZ130 cassettes were constructed as follows.

Transcriptional Initiation Region

Plasmid DNA isolated from pCGN2901 (see above) was digested to completion with *Nco*I and then treated with exonuclease isolated from mung bean (Promega, Madison, WI) to eliminate single-stranded DNA sequences, including the ATG sequence making up a portion of the *Nco*I recognition sequence. The sample was then digested to completion with *Sac*I. The resulting 1.8 kb 5' *Sac*I to *Nco*I fragment was

then inserted into pCGN2015 (described above) to create pCGN2904.

In order to eliminate redundant restriction enzyme sites and make subsequent cloning easier, plasmid DNA isolated from pCGN2904 was digested to completion with *SalI* and *EcoRI* and the resulting 1.8 kb fragment, containing the pZ130 5' sequences, inserted into pBluescriptII (Stratagene; La Jolla, CA) to create pCGN2907.

Transcriptional and Translational Termination Region

Plasmid DNA isolated from pCGN2901 was digested to completion with *EcoRI* and *BamHI*. The resulting 0.72 kb *EcoRI* to *BamHI* fragment located downstream (3') from the pZ130 coding region was inserted into pCGN2907 creating pCGN2908.

The insertion of the 0.5 kb (approximately) DNA sequence, including the pZ130 gene TAA stop codon and those sequences between the stop codon and the *EcoRI* site downstream (3') and the addition of unique restriction sites to facilitate insertion of foreign genes, was accomplished as follows.

A polylinker/"primer" comprising the sequence 5'GTTCTGCAGCATGCCCGGGATCGATAATAATTAAGTGAGGC-3' was synthesized to create a polylinker with the following sites: *PstI*-*SphI*-*SmaI*-*ClaI* and to include the pZ130 gene TAA stop codon and the following (3') 13 base pairs of the pZ130 gene 3' region sequence. Another oligonucleotide comprising the sequence 5'- CAAGAATTCATAATATTATATATAC 3' was synthesized to create a "primer" with an *EcoRI* restriction site and 16 base pairs of the pZ130 gene 3'

region immediately adjacent to the *EcoRI* site located approximately 0.5 kb 3' of the pZ130 gene TAA stop codon.

These synthetic oligonucleotides were used in a polymerase chain reaction (PCR) in which plasmid DNA isolated from pCGN2901 was used as the substrate in a thermal cycler (Perkin-Elmer/Cetus, Norwalk, CT) as per the manufacturer's instructions. The resulting 0.5 kb DNA product was digested to completion with *PstI* and *EcoRI* and the resulting 0.5 kb DNA fragment inserted into pCGN2908 to create pCGN2909. The complete DNA sequence of the 0.5 kb region from the *PstI* site to the *EcoRI* site was determined using the Sanger et al. (1971) dideoxy technique to verify that no mistakes in the sequence had occurred between the oligonucleotide primers during the PCR reaction.

The pZ130 cassette, pCGN2909, thus comprises the 5' pZ130 DNA sequences from the *Sall* site at position 808 to position 2636 (see Figure 2), unique *PstI*, *SphI* and *SmaI* sites which can be conveniently used to insert genes, and the 3' pZ130 DNA sequences from the TAA stop codon at position 3173 (Figure 2) through the *BamHI* site at position 4380.

Example 8

Preparation and Analysis of Test Constructs

A β -glucuronidase (GUS) reporter gene was used to evaluate the expression and tissue specificity of the pZ130-GUS constructions. GUS is a useful reporter gene in plant systems because it produces a highly stable enzyme, there is little or no background (endogenous) enzyme

activity in plant tissues, and the enzyme is easily assayed using fluorescent or spectrophotometric substrates. (See, for example, Jefferson, *Plant Mol. Rep.* (1987) 5:387-405.) Histochemical stains for GUS enzyme activity are also
5 available which can be used to analyze the pattern of enzyme accumulation in transgenic plants. Jefferson (1987), *supra*.

A pZ130 cassette, pCGN2928, was prepared by inserting the 3.2 *KpnI* to *SalI* fragment of pCGN2059 into the *KpnI* and
10 *SalI* sites of pCGN2909. pCGN2059 was prepared by inserting the 3.2 *SalI* to *BglIII* fragment of pCGN2902 into M13mpl9. pCGN2928 is thus identical to pCGN2909 except that it includes an additional approximately 3.2 kb of pZ130 DNA sequence upstream of the *SalI* site located at position 808
15 of Figure 2.

Preparation of Test Constructs pCGN2917 and pCGN2918

These constructs contain 1.8 kb of pZ130 5' sequence, the GUS gene coding region and 1.2 kb of pZ130 3' sequence. pCGN2917 and pCGN2918 differ from each other only in the
20 orientation of the pZ130/GUS construction with respect to the other elements of the binary vector plasmid for example, the 35S promoter from CaMV.

The constructs were made by inserting the *PstI* fragment of pRAJ250 (Jefferson (1987) *supra*), or any other
25 plasmid construct having the *PstI* fragment containing the GUS coding region, into the *PstI* site of pCGN2909. The resulting plasmid, having the GUS gene in the sense orientation with respect to the pZ130 gene promoter region, was named pCGN2914. The pZ130/GUS construction was excised

as an *Xba*I to *Kpn*I fragment and cloned into the binary vectors pCGN1557 and pCGN1558 to make pCGN2917 and pCGN2918, respectively. pCGN1557 and pCGN1558 are described in McBride and Summerfelt, *Plant Mol. Bio.* (1990) 14:269-296.

Preparation of Test Construct pCGN2926

This construct contains 5 kb of pZ130 5' sequence, the GUS gene coding region and 1.2 kb of pZ130 3' sequence. It was made by inserting the 3.2 kb *Kpn*I to *Sal*I fragment of pCGN2059 into the *Kpn*I and *Sal*I sites of pCGN2914. The resulting plasmid was named pCGN2923. The pZ130/GUS/pZ130 construction was then excised from pCGN2923 as an *Xba*I to *Kpn*I fragment and cloned into the binary vector pCGN1557 resulting in pCGN2926.

Analysis of GUS Enzyme Activity

β -glucuronidase activity of transformants was measured using 4-methyl-umbelliferyl glucuronide as a substrate, as outlined in Jefferson (1987) *supra*. GUS enzyme activity was easily detected in the ovaries of the transformed plants and quantitatively was quite high in comparison with the activity background observed in ovaries isolated from nontransformed tomato plants and from leaves of transformed plants. Interestingly, upon comparison of the pCGN2917 and pCGN2918 transformants, it was found that proximity to a 35S CaMV enhancer region (pCGN1558) may reduce, or eliminate, ovary-tissue specificity.

Example 9PZ-7 Cotton TransformationExplant Preparation

Coker 315 seeds were surface disinfected by placing in
5 50% Clorox (2.5% sodium hypochlorite solution) for 20
minutes and rinsing 3 times in sterile distilled water.
Following surface sterilization, seeds were germinated in
25 x 150 sterile tubes containing 25 mls 1/2 x MS salts:
1/2 x B5 vitamins: 1.5% glucose: 0.3% gelrite. Seedlings
10 were germinated in the dark at 28°C for 7 days. On the
seventh day seedlings were placed in the light at 28±2°C.

Cocultivation and Plant Regeneration

Single colonies of *A. tumefaciens* strain 2760
containing binary plasmids pCGN2917 and pCGN2926 were
15 transferred to 5 ml of MG/L broth and grown overnight at
30°C. Bacteria cultures were diluted to 1×10^8 cells/ml
with MG/L just prior to cocultivation. Hypocotyls were
excised from eight day old seedlings, cut into 0.5-0.7 cm
sections and placed onto tobacco feeder plates (Horsch *et*
20 *al.* 1985). Feeder plates were prepared one day before use
by plating 1.0 ml tobacco suspension culture onto a petri
plate containing Callus Initiation Medium CIM without
antibiotics (MS salts: B5 vitamins: 3 % glucose: 0.1 mg/L
2,4-D: 0.1 mg/L kinetin: 0.3% gelrite, pH adjusted to 5.8
25 prior to autoclaving). A sterile filter paper disc (Whatman
#1) was placed on top of the feeder cells prior to use.
After all sections were prepared, each section was dipped
into an *A. tumefaciens* culture, blotted on sterile paper
towels and returned to the tobacco feeder plates.

Following two days of cocultivation on the feeder plates, hypocotyl sections were placed on fresh Callus Initiation Medium containing 75 mg/L kanamycin and 500 mg/L carbenicillin. Tissue was incubated at $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 30uE 16:8 light:dark period for 4 weeks. At four weeks the entire explant was transferred to fresh callus initiation medium containing antibiotics. After two weeks on the second pass, the callus was removed from the explants and split between Callus Initiation Medium and Regeneration Medium (MS salts: 40mM KNO_3 : 10 mM NH_4Cl :B5 vitamins:3% glucose:0.3% gelrite:400 mg/L carb:75 mg/L kanamycin).

Embryogenic callus was identified 2-6 months following initiation and was subcultured onto fresh regeneration medium. Embryos were selected for germination, placed in static liquid Embryo Pulsing Medium (Stewart and Hsu medium: 0.01 mg/l NAA: 0.01 mg/L kinetin: 0.2 mg/L GA3) and incubated overnight at 30°C . The embryos were blotted on paper towels and placed into Magenta boxes containing 40 mls of Stewart and Hsu medium solidified with Gelrite. Germinating embryos were maintained at $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 50 uE $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 16:8 photoperiod. Rooted plantlets were transferred to soil and established in the greenhouse.

Cotton growth conditions in growth chambers are as follows: 16 hour photoperiod, temperature of approximately $80-85^\circ$, light intensity of approximately 500uEinsteins. Cotton growth conditions in greenhouses are as follows: 14-16 hour photoperiod with light intensity of at least 400uEinsteins, day temperature $90-95^\circ\text{F}$, night temperature $70-75^\circ\text{F}$, relative humidity to approximately 80%.

Plant Analysis

Flowers from greenhouse grown T1 plants were tagged at anthesis in the greenhouse. Squares (cotton flower buds), flowers, bolls etc. were harvested from these plants at various stages of development and assayed for GUS activity. GUS fluorometric and histochemical assays were performed on hand cut sections as described in Jefferson (1987), *supra*.

At least ten events (transgenic plants) from each construct (pCGN2917 and pCGN2926) were sent to the Growth Chambers/Greenhouse. Approximately 80% (9/11) of the 2917 plants and 100% (12/12) of the 2926 plants expressed GUS at a level detectable by either fluorometric or histochemical assay. Squares from several of pCGN2917 and pCGN2926 transfected plants were assayed for GUS expression using histochemical analysis wherein the cells which are expressing GUS stain blue. Preliminary analysis indicates that all plants expressed GUS in the developing floral parts. Ovules and anthers stained extremely dark. Bracts and locule walls were also blue in some cases. Fibers from 5, 9 and 12 DPA bolls off these plants were also expressing GUS.

Several GUS assays were done on developing bolls at stages from squaring through 53 days post anthesis. GUS activity is very high in squares and flowers. Activity in bolls varies from plant to plant. Activity was present in fiber from two of the 2926 plants at 43 and 53 dpa.

β -glucuronidase is a very stable enzyme; therefore, presence of GUS activity may not be directly correlated in a temporal manner with gene expression, however, the

specificity of expression in tissues and/or structures derived from ovary integument was significant. Other tissues not derived from ovary integument, showed no GUS activity above background. Differences in the breakdown of GUS as well as differences in expression may explain the variability of expression patterns.

Comparisons between Cotton and Tomato Expression

An initial MUG assay was done on tissues from tomato and cotton plants transfected with pCGN2917 and pCGN2918. GUS activity was found in tomato roots, stems and leaves as well as meristems, and floral parts. The amount of activity varied from plant to plant. In cotton, activity was highest in floral parts but was detectable in roots and stems of some plants.

T2 tomato plants from 2926 and 2917 are being tagged at anthesis. These plants have been tested for both kan and GUS expression. As the tissue matures it will be assayed and photographed.

20

Example 10

Expression of Transgenic Melanin Synthesis Genes

A binary construct for plant transformation to express genes for melanin synthesis is prepared as follows. The mel operon of *Streptomyces antibioticus* (Bernan et al. (1985) 34:101-110) is subcloned as a BclI fragment into a Bluescript vector. NcoI and BamHI sites are inserted by mutagenesis immediately 5' to (and including) the ATG initiation codon for ORF438. The resulting plasmid is

pCGN4229. pCGN4229 is further mutagenized by inserting a PstI site immediately following the ORF438 stop codon and by the addition of NcoI and BamHI sites at the start codon of the tyrA locus, thus, providing the mutagenized mel operon. A PstI site from the plasmid vector is similarly located immediately 3' to the tyrA encoding region.

The pZ130 cassette, pCGN2909, is mutagenized to reinsert the NcoI site including the ATG codon for the initial MET of the pZ130 encoded sequence, and results in pCGN4228. pCGN4228 is mutagenized to delete the BamHI site at the 3' end of the pZ130 transcriptional termination region and to insert an AscI linker fragment in its place, resulting in pCGN4235. pCGN4228 is also mutagenized to delete the 3' BamHI site and insert an AscI linker 5' to the pZ130 transcriptional initiation region (at XhoI/SalI digested and Klenow treated pCGN4228) resulting in pCGN4241.

The Streptomyces ORF438 region is obtained by digestion of the mutagenized mel operon construct with NcoI and PstI and inserted into Nco/Pst digested pCGN4235. The tyrA region is cloned as an NcoI/PstI fragment from the mutagenized mel operon construct into Nco/Pst digested pCGN4241.

A fragment of the tobacco ribulose biphosphate carboxylase small subunit gene encoding the transit peptide and 12 amino acids of the mature protein is inserted in reading frame with the ORF438 encoding sequence as an NcoI/BamHI fragment. The fragment is similarly inserted in front of the tyrA encoding sequence. The resulting

constructs contain the transit peptide/ORF438 and transit peptide/tyrA fusions positioned for expression from the pZ130 5' and 3' regulatory regions.

A binary vector (See Figure 7) for insertion of the ORF438 and tyrA constructs is prepared from pCGN1578 (McBride et al., supra) by substitution of the pCGN1578 linker region with a linker region containing the following restriction digestion sites: Asp718/Asc/Pac/XbaI/BamHI/Swa/Sse/HindIII. (See Figure 8). This results in pCGN1578PASS. Asc, Pac, Swa and Sse are restrictive enzymes that cut at the 8-base recognition sites. The enzymes are available from New England BioLabs: Asc, Pac; Boehringer Mannheim: Swa; and Takara (Japan): Sse.

The ORF438 pZ130 construct is inserted into pCGN1578PASS as an Asp/Asc fragment. The tyrA pZ130 construct is inserted adjacent to the ORF438 pZ130 construct as an Asc/Xba fragment.

20

Example 11

Expression of Transgenic Melanin Synthesis Genes in Tobacco Plants

Transgenic tobacco plants were generated using techniques and DNA constructs as provided in Examples 8-10.

A set of untransformed plants was utilized as a control. All of the untransformed control plants utilized in this following experiment exhibited normal growth and development phenotypes. (See Table 1.)

A first set of transgenic plants was obtained using binary vector pCGN4269 which expressed both the ORF438 and tyrA genes involved in melanin synthesis in the cytosol of these tobacco plants. Transgenic plants obtained using
5 pCGN4269 contained a DNA construct containing the pZ130 transcriptional and translational region from tomato which was used to drive expression of the OFR438 and tyrA gene products. Cytosol-specific expression of the melanin synthesis genes yielded transgenic plants having a normal
10 phenotype as compared to untransformed control tobacco. (Table 1.) Melanin synthesis is not detectable in these plants as the substrates for melanin production are not expected to be present at high levels in the cytosol.

A second set of transgenic plants was obtained using
15 binary vector pCGN4272 which specifically targeted the polypeptides expressed from the melanin synthesis genes to the plastids of these plants. Transgenic plants transformed with pCGN4272 contained a DNA construct containing the tomato pZ130 transcriptional and translational initiation
20 region and DNA encoding a tobacco SSU transit peptide and a 6 amino acid region of the mature SSU polypeptide coupled to the OFR438 gene and DNA encoding a tobacco SSU transit peptide and a 6 amino acid region of the mature SSU polypeptide coupled to the tyrA gene. The transit peptide
25 was used to direct the transport of the ORF438 and tyrA gene products to the plastids of these plants. Plastid-targeted expression of the melanin synthesis ORF438 and tyrA products resulted in plants having altered phenotype (see Table 1). The phenotypic alterations included

meristem abortion, stunted growth, narrow leaves, and new leaf curling. Alteration of plant color was also observed: some of the transgenic plants exhibited meristem yellowing and black streaks over various portions of the plant and different meristematic regions relative to control plants. In addition, the basal flower buds of these transgenic plants were extremely dark compared to those transgenic plants which expressed the cytosol-specific melanin synthesis gene products or compared to control plants. The pZ7 promoter is known to result in foreign gene expression in ovary and meristem derived tissue. The observation of this phenotype is believed to be due to depletion of the tyrosine amino acid pools in the plastid and/or the effect of auxin-like melanin compounds on plant growth and development.

TABLE 1

| | Number of Plants Generated <u>Phenotype</u> | Plants Having Altered | |
|----|---|--------------------------|----|
| 20 | Control | 20 | 0 |
| | Cytosol-Specific DNA Construct | 40 | 0 |
| 25 | Plastid-Specific DNA Construct | 52 | 40 |

30

Example 12

Constructs for Targeting Pigment Synthesis Genes

Constructs which contain encoding sequences for bacterial genes involved in biosynthesis of pigmented compounds and sequences for directing transport of the

encoded proteins into plastids or vacuoles are prepared.

The sequences are manipulated to be present on an *NcoI/EcoRI* fragment which may then be further manipulated to add transcriptional initiation regions useful for

- 5 providing transcription in plant tissues. Examples of useful promoters include pZ7, T7 (for plastid expression), and various promoters capable of providing for expression in cotton fibers or plant flower petals.

- For plastid targeting, the constructs contain a
10 fragment of the tobacco ribulose biphosphate carboxylase small subunit gene encoding the transit peptide and 12 amino acids of the mature protein (Tssu) positioned in reading frame with the appropriate encoding sequence. For production of indigo, pCGN5128 (Tssu::tna) and pCGN5129
15 (Tssu::pig) find use for plastid targeting. The designation *tna* stands for the gene encoding tryptophanase from *E. coli*, an enzyme which converts tryptophan to indole (Stewart et al., (1986) *J Bacteriol* 166:217-223). The *pig* designation is used for the encoding sequence to the
20 protein for indigo production from *Rhodococcus*, which produces indigo from indole (Hart et al., (1990) *J Gen Microbiol* 136:1357-1363). Both *tna* and *pig* were obtained by PCR. In pCGN5128 and pCGN5129 the transit from SSU includes the tobacco 54 amino acid transit peptide plus 12
25 amino acids from the mature small subunit protein.

For production of melanin in plants, constructs pCGN5075 (Tssu::TyrA) and pCGN5076 (Tssu::ORF438) find use for plastid targeting. In this approach melanin synthesis comes from the expression of two proteins from *Streptomyces*

antibioticus, the *tyrA* which converts tyrosine to melanin and the ORF438, which is believed to assist the *tyrA* enzyme in copper binding (Bernan *et al.*, (1985) *Gene* 37:101-110). Both proteins were obtained by PCR. In pCGN5076 and

5 pCGN5075 the transit from SSU also includes the tobacco 54 amino acid transit peptide plus 12 amino acids from the mature small subunit.

For vacuolar targeting of the melanin synthesis genes, constructs include a fragment of the

10 metalloprotease inhibitor gene, encoding the entire 32 amino acid N-terminus signal peptide of that protein plus 6 amino acids of the mature protein (CPI+6) (Martineau *et al.*, *supra*), positioned in reading frame with the appropriate encoding sequences. In addition to the signal

15 peptide, a sequence encoding a vacuolar localization signal (VLS) is inserted 3' of the protein encoding sequence. Thus, for melanin production in vacuoles, CPI+6::*tyrA*::VLS and CPI+6::ORF438::VLS are used. In this example, the VLS utilized is the 8 amino acids obtained from beyond the C

20 terminus of the metalloprotease inhibitor gene described in Martineau *et al.*

As shown by the above results, expression of a gene of interest can be obtained in cells derived from ovary cells, including tomato fruit and cotton fibers, and expression of

25 genes involved in synthesis of pigments combined with appropriate targeting sequences results in modification of color phenotype in the selected plant tissue.

All publications and patent applications cited in this specification are herein incorporated by reference as if each individual publication or patent application were specifically and individually indicated to be incorporated
5 by reference.

Although the foregoing invention has been described in some detail, by way of illustration and example for purposes of clarity and understanding, it will be readily apparent to those of ordinary skill in the art that certain
10 changes and modifications may be made thereto, without departing from the spirit or scope of the appended claims.

CLAIMS

What is claimed is:

1. A DNA sequence comprising as operably joined
5 components in the direction of transcription, a transport
signal encoding sequence from a plant nuclear-encoded gene,
and an open reading frame encoding a protein required for
synthesis of a pigment.
2. The DNA sequence according to Claim 1, wherein
10 said transport signal encoding sequence encodes a plastid
transit peptide.
3. The DNA sequence according to Claim 2, wherein
said sequence further comprises a portion of the mature
protein encoding region for said plant nuclear-encoded
15 gene.
4. The DNA sequence according to Claim 1, wherein
said transport signal encoding sequence encodes a signal
peptide which provides for transport across the rough
endoplasmic reticulum.
- 20 5. The DNA sequence according to Claim 4, wherein
said sequence further comprises, 3' to said open reading
frame, a vacuolar localization signal.
6. The DNA sequence of Claim 1 wherein said pigment
is melanin or indigo.
- 25 7. The DNA sequence of Claim 6 wherein said open
reading frame is from a bacterial gene.
8. The DNA sequence of Claim 7 wherein said bacterial
gene is selected from the group consisting of ORF438, tyrA,
pig, and tna.

9. A DNA construct comprising a promoter for transcription in a plant cell operably joined to said DNA sequence of Claim 1.

10. The DNA construct of Claim 9 wherein said plant cell is a cotton fiber cell.

11. The DNA construct of Claim 10 wherein said promoter is a tomato pZ7 promoter.

12. The DNA construct of Claim 9 wherein said plant cell is a flower petal cell.

13. A plant cell comprising a DNA construct of Claim 9.

14. A plant comprising a cell of Claim 13.

15. A method of modifying color phenotype in a plant tissue, said method comprising:

transforming a plant cell with DNA comprising a construct for expression of a protein in a pigment biosynthesis pathway, wherein said construct comprises as operably joined components:

a transcriptional initiation region functional in cells of said plant tissue,

a transport signal encoding sequence from a plant nuclear-encoded gene,

an open reading frame encoding a protein required for synthesis of a pigment, and

a transcriptional termination region functional in cells of said plant tissue,

wherein said plant tissue comprises a substrate of said protein; and

growing said plant cell to produce a plant comprising said tissue, wherein said protein reacts with said substrate to produce said pigment.

16. The method of Claim 15 wherein said transport
5 signal encoding sequence encodes a plastid transit peptide.

17. The method of Claim 15 wherein said transport signal encoding sequence encodes a signal peptide which provides for transport across the rough endoplasmic reticulum.

10 18. The method of Claim 16 wherein said DNA comprises constructs for expression of two proteins in a pigment biosynthesis pathway, wherein each of said constructs comprises components i) through iv), and wherein said two proteins are not encoded by the same gene.

15 19. The method of Claim 17 wherein said DNA comprises constructs for expression of two proteins in a pigment biosynthesis pathway, wherein each of said constructs comprises components i) through iv), and wherein said two proteins are not encoded by the same gene.

20 20. The method of Claim 18 or 19 wherein said pigment is melanin and said proteins are encoded by *tyrA* and ORF438.

21. The method of Claim 18 wherein said pigment is indigo and said proteins are *tna* and *pig*.

25 22. The method of Claim 15 wherein plant tissue is a cotton burr.

23. The method of Claim 15 wherein said plant tissue is a flower petal.

1/11

1 AAAAAACAAAAACATTTCTAATCTTTTTCACATCCATGGCTCGTTCCATTTTCTTCATGGCATTT 69
TTTCTTTTGTGTTTGTAAAGATTAGAAAAAGTGAGTAAGGTACCGAGCAAGGTAAAAAGAAGTACCGTAAA
LysLysThrLysThrPheLeuIlePhePheThrHisSerMETAlaArgSerIlePhePheMETAlaPhe
70 TTGGTCTTGGCAATGATGCTCTTTTGTGTACCTATGAGGTAGAAGCTCAGCAAAATTTGCAAAAGCACCAGC 138
AACCAGAAACCGTTACTACGAGAAACAATGGATACTCCATCTTCGAGTCGTTTAAACGTTTTCGTGGTTCG
LeuValLeuAlaMETMETLeuPheVALThrTyrGluValGluAlaGlnGlnIleCysLysAlaProSer
139 CAAACTTTCCAGGATTATGTTTATGGACTCATCATGTAGAAAATATTTGTATCAAAAGAGAAAATTTACT 207
GTTTGAAAGGTCCTAATACAAAAATACCTGAGTAGTACATCTTTTATAACATAGTTTCTCTTTAAATGA
GlnThrPheProGlyLeuCysPheMETAspSerSerCysArgLysTyrCysIleLysGluLysPheThr
208 GGTGGACATTGTAGCAAACTCCAAAGGAAGTGTCTATGCACCTAAGCCATGTGTATTTGACAAAAATCTCA 276
CCACCTGTAACATCGTTTGAGGTTTCCCTTACAGATACGTGATTCGGTACACATATAAACTGTTTATAGAGT
GlyGlyHisCysSerLysLeuGlnArgLysCysLeuCysThrLysProCysValPheAspLysIleSer
277 AGTGAAGTTAAAGCAACTTTGGGTGAGGAAGCAAAACTCTAAGTGAAGTTGTGCTTGAAGAAGAGATT 345
TCACTTCAATTTTCGTTGAAACCCACTCCTTCGTTTGTGAGATTCACTTCAACACGAACTTCTTCTCTAA
SerGluValLysAlaThrLeuGlyGluGluAlaLysThrLeuSerGluValValLeuGluGluIle
346 ATGATGGAGTAATAATTAAAGTGAGGTTAAATAAGGATTTTGAGTGTCAAAAAAATAATAAAG 414
TACTACCTCATTTAATTCACTCCAAATTATTCTCTAAACTCACAGTTTCTTTTGTGTTTAAATTATTC
METMETGlu . . LeuSerGluValLys . GlyPhe . ValSerLysLysThrLysLeuIleLys

FIGURE 1A

2/11

415 TGTTGCCCTTTCTTATTAGGGTAGCTTGTGATGTTGTGTTAGTATTGGCCTATAGTAGCCATTTGACAC 483
ACAACGGAAAGAATAATCCCATCGAACACTACACACAATCATACCGGATATCATCGGTAAACTGTG
CysCysLeuPheLeuGly : LeuValMETLeuCys . TyrTrpProIleValAlaIle . His

484 ATTAAATAAGTTTGTGACACATCATTAATCCTTATGTATGTATGTTTAAATGAAAAATGATCGACTACG 552
TAATTTATTCAAACACTGTGTAGTAATTAGGAATACATACATACAAAAATTACTTTTACTAGCTGATGC
IleLys . ValCysAspThrSerLeuIleLeuMETTyrValCysPheAsnGluLys . SerThrThr

553 ATCTTTTAATTTT 564
TAGAAATTAAAA
IlePheAsnPhe

FIGURE 1B

3/11

| | | | |
|------|-------------------------|------|-----------------------|
| 1 | GCTCCACTACTCTCATCACTT | 49 | AGCCCTTCTTTTATACCAA |
| 50 | GGCATCATCAATCTCATTAACA | 98 | AGATTAGGGTTTTTCAAGATT |
| 99 | GGATTCAATAGCTTCAATGCT | 147 | TATTTATCACAATTATATAAT |
| 148 | TTCATACAAAGCATACAAATTA | 196 | AGGTTTACAATACTACCC |
| 197 | AATACATATCATTCGCTATTAA | 245 | AGGTTTACGAATAGCATAAAC |
| 246 | AACCTACCTCCACCGAAGAAAT | 294 | CGGATCAACAATCTACTTTCC |
| 295 | CTGCGTTCTTCTTCTCTCTCT | 343 | CTGTTCTGTTCTTCTCCCTC |
| 344 | TCCTTGTCTCTTCTATTTTCT | 392 | TATTAACCCCTCTTTTACCC |
| 393 | ATTAGTATATAATTAAAGTATA | 441 | AAAGATGATAAAATACCCCAT |
| 442 | TTTGAAGGTTATCTCTTTTAG | 490 | CCCCCAAGTAATTGAATTAT |
| 491 | AACCACTAACTTTATAATTATA | 539 | AGCAGTAAGTCCAAAACGCC |
| 540 | AAATATTTAACAGAAATCCGAC | 588 | CCAGTCACGCAGCCTGTANCG |
| 589 | GNNCACAACGTGACGGTCCGT | 637 | CCCTGATGGCCGTCACAAAGT |
| 638 | AGTTAATTTCTGTGGAAGATGT | 686 | GTANGTNGTCGTGCCACGACG |
| 687 | GTCCCTGTCATTTCTGTTACGA | 735 | AGTTTCAGTAGAGTCGATTTT |
| | ECORI | | |
| 736 | TTTCAGAAATCTAAGTGT | 784 | TTTGAACGAGACCCCNCGGTC |
| | BamHI | | |
| 785 | CATGACGGTTCGTCCGTGGGAT | 833 | CCGTCGACTCAGCCAGTTTTT |
| 834 | TAAATCTGCTGCTCAAAACGAC | 882 | TAAACAGGTCGTTACAAAGTA |
| 883 | TCAAATAAAAGAAATAAATTC | 931 | TTTCCAAATACATATATTGTT |
| 932 | ACAGTGTTAACACAGGGAATGT | 980 | AAATCGTTGCCTCAATCGATT |
| | BglII | | |
| 981 | TGAAATTAAGATTGATTAGATCT | 1029 | TCTTTAAAGATAACAATGTC |
| 1030 | TAAATTGAATGAATGAATTAGCT | 1078 | ATATTATCATTTGAAAAAGAA |
| 1079 | AAAACAGATTGATAATAAAATA | 1127 | ATAAATGACTTTGCATCTAA |

FIGURE 2A

4/11

1128 GCTAGAAAGCAGATTTTAAATAAAATACATATGATATAAAAAAAGATA 1176
 1177 AATTAGAGTCATCCCATAAATTTTCGCTTTAGGCCCCCAATGTGTAAAG 1225
 1226 TCGGCCCTGAAAAATAGGAATGGTATTAATAATTTTGTGTTGATTTACACA 1274
 1275 CTTGATATTTGACATTCATATAGAAAAATAATTAAATTTATATTCGTGT 1323
 1324 AGAGTGGTCTCACATTAATGGGTAAATATTTCCACACAAAAACTATTT 1372
 1373 TACAATCATAGCTAGAAATCTGAAATATCTAATGTAATCTCCACCCAATTAA 1421
 1422 TTAAAGATGATTTTCTGCTTAAATAATAAAAAATATGTCTATTTGCCAAA 1470
 1471 CTACTAATAGATGTACTCACAAAAATAATAAAAAATCAAGTGTA 1519
 1520 TATACAAATGATTCGGAAGGCCATTTTGAATAATTTTCATAAAATGACCG 1568
 1569 TTTTACCCGTTCACAATTTGTTGTTTCAGCAATTTTGTGTTTGTGGA 1617

HindIII

1618 TTTGGTTATGGAAGTTCAATAAAAAAGTTGTGGTTTATAAGCTTTGGAG 1666
 1667 TTTTGAAAGGTTTAAGTTGATTAAGTAGTTTGTAGTGTCATTTGGAG 1715
 1716 TTTTCGTGCTTGAAATAAAATTTTATCACTGCAATGATTTTCAAAATGTC 1764
 1765 GAGTTTGGTTAAGTAGAGGTTTTCATTCGGAGTTTTCATGATTAAT 1813
 1814 TAAATGTTAAAGCTGAAAGTTTATGAAATTTTAGCCTTTGAGTTAATTT 1862
 1863 TCATGCTTGAAATTAATTTTGAGAAATTTTTCGAAATCTGGGATAAT 1911
 1912 GTTAGGTCCTTAGAGAAAGTCTGGTTGAATTTTCATAGCTCAAGAGATTAG 1960
 1961 TTTTGACTTTTTCAGGCATTTTGTGTTGTTTATTACGATTTTCACGGACTT 2009
 2010 TCGAATTAAGGAGACTTCAAAAATTCATATTTAATGGTTTCGTGTTTCGT 2058
 2059 TAGTTTAAAAATCGTGCTTTTATAGGATTTATACCTTAAAAAATAAA 2107
 2108 ATAAAAATAAAGTACTACTAACATGTAATCTGTCTATAAGATAAGGTTGT 2156
 2157 ACATTTAGGACTATTTGAATATTTCATCAAAAAATAAAAAAGTAGAGAT 2205

2206 GATAGTAATATAAAATATTTATTTTTCATTTTACATTTTGATATTTTAATA 2254
 2255 CTAACAAATATGACATAATAAAATTTGTATTCAGATTTGTAATAATTTCCC 2303
 2304 TAAAAAAGATACCTTTTACTGTGGTGGCTCAAAATTCAAAAATTTTCTAAG 2352

FIGURE 2B

5/11

| | | |
|------|--|------|
| 2353 | AAAACTACTAATAATTGATTTCCTAATTAAAAATTCGATATATATATAT | 2401 |
| 2402 | AT | 2450 |
| 2451 | TTTTTCTTTTTTTTTTACTTCACATATTTTTTGGSCSACCAATTTTTTTT | 2499 |
| 2500 | TAACTTTTTTTGGTCTTACTCTTATTTCACTCCCTATATAAATAACTCCCAT | 2548 |
| 2549 | TGTGTGATATTTTTTATTCACAACCTCTAACTTACAATCTTTCTTATTATT | 2597 |
| | Nco I | |
| 2598 | AAAAAAAAAACAACATTTCTAATCTTTTTTCACTCATTCATGGCTCGT | 2646 |
| 2647 | TCCATTTTTCTTCATGGCATTTTTTGGTCTTGGCAATGATGCTCTTTGTTA | 2695 |
| 2696 | CCTATGgtttgtcttcataaatttattcctctaaaaatcatcgcaataaaa | 2744 |
| 2745 | aaaaatgtaacgaagcagacatcagtaaaacggtttaataaaacccctaa | 2793 |
| 2794 | aaaaattgtgaattgataattacttgctatacgtttaacaactatgataa | 2842 |
| 2843 | aaaaaccctaaaaatatacttatttcgatttcgctctctcatgttattc | 2891 |
| 2892 | taactattttttgtgtgtgaatgattgtagAGGTAGAAGCTCAGCAAAAT | 2940 |
| 2941 | TTGCAAGCACCAAGCCAAACTTTCCAGGATTATGTTTTTATGGACTCA | 2989 |
| 2990 | TCATGTAGAAAAATATTGTATCAAGAGAAAAATTTACTGGTGGACATTGTA | 3038 |
| 3039 | GCAAACTCCAAAGGAAGTGTCTATGCCACTAAGCCATGTGTATTTGACAA | 3087 |
| 3088 | AATCTCAAGTGAAGTTAAAGCAACTTTGGGTGAGGAAGCAAAAACCTCTA | 3136 |
| 3137 | AGTGAAGTTGTGCTTGAAGAAGACAGATTATGATGGAGTAATAATAAGTC | 3185 |
| 3186 | AGGTTAAATAAGGATTTTGAGTGTCAAAAAACAAAAATTAATAAAGTG | 3234 |
| 3235 | TTGCCCTTTTCTTATTAGGGTAGCTTGTGATGTTGTGTAGTATTGGCCT | 3283 |
| 3284 | ATAGTAGCCATTTGACACATTAAATAAAGTTTGTGACACATCATTAATCC | 3332 |
| 3333 | TTATGTATGTATGTTTTTAAATGAATAAATGATCGACTACGATCTTTAATTT | 3381 |
| 3382 | TATGTTTTTACATTTAATTAATCACTTTCTGTACGATTCAATTTATCTAG | 3430 |
| 3431 | TTATGAATGAAATATAGAGTGAATTTGAAGTAAGGAGCTAGCTTCAAAAC | 3479 |
| 3480 | AAAGACGTACATATGTACAAAGTAGGGTACTATTAAACCTCTTTTTTAT | 3528 |

FIGURE 2C

6/11

GENOMIC CLONE 140.

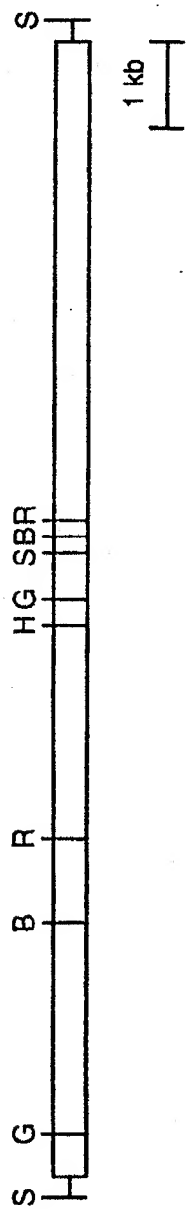


FIGURE 3

GENOMIC CLONE 116.

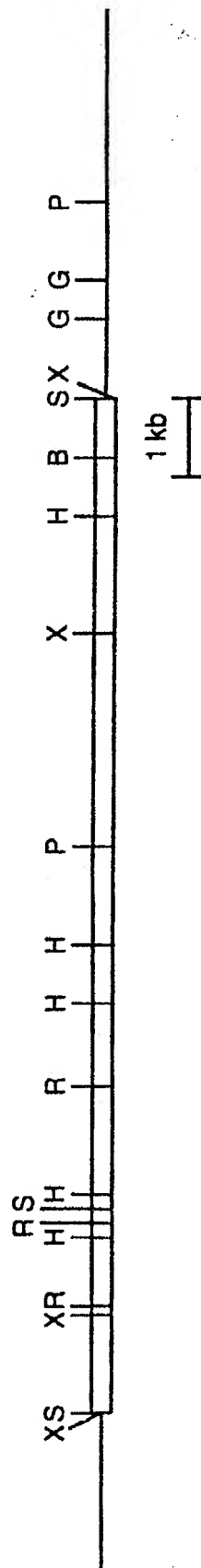


FIGURE 5

7/11

pZ70

1 ATTATTATTACCATGGCACAAAAATTTACTATCCTTTTACCATTCTCCTTGTGGTTATTGCTGCTCAA 69
METAlaGlnLysPheThrIleLeuPheThrIleLeuValValIleAlaAlaGln
Mature Protein Start

70 GATGTGATGGCACAAAGATGCAACTCTGACGAAACTTTTTCAGCAATATGATCCAGTTTGTCCACAAACCT 138
AspValMETAlaGlnAspAlaThrLeuThrLysLeuPheGlnGlnTyrAspProValCysHisLysPro

139 TGCTCAACACAAAGACGATTGTTCTGGTGGTACGTTCTGTCAGGCCCTGTTGGAGGTTTCGCGGGGACATGT 207
CysSerThrGlnAspAspCysSerGlyGlyThrPheCysGlnAlaCysTrpArgPheAlaGlyThrCys
Mature Protein End

208 GGGCCCTATGTTGGCGCGCCATGGCCATAGCGGTGTGATTACAAATTCGTTGTTCTTCTTTTTCGACT 276
GlyProTyrValGlyArgAlaMETAlaIleGlyVal

277 TTTTAATCCCCAAGTGAAATAAAGTCTAATTCGAAAAAGAGAAAAAGTATCTATGTCTGAGTTATATGT 345

346 TTTGTGGCTAATAAGAAATCGACTATGCTTGTGATTGATAAAAAATATATGTCATTAGGGTGTGATATG 414

415 TAATCATCAAAATTAAATAAAAAATCATCGCATTTGTGTGTG 453

FIGURE 4

8/11



UC82B

UC82B

FIGURE 6

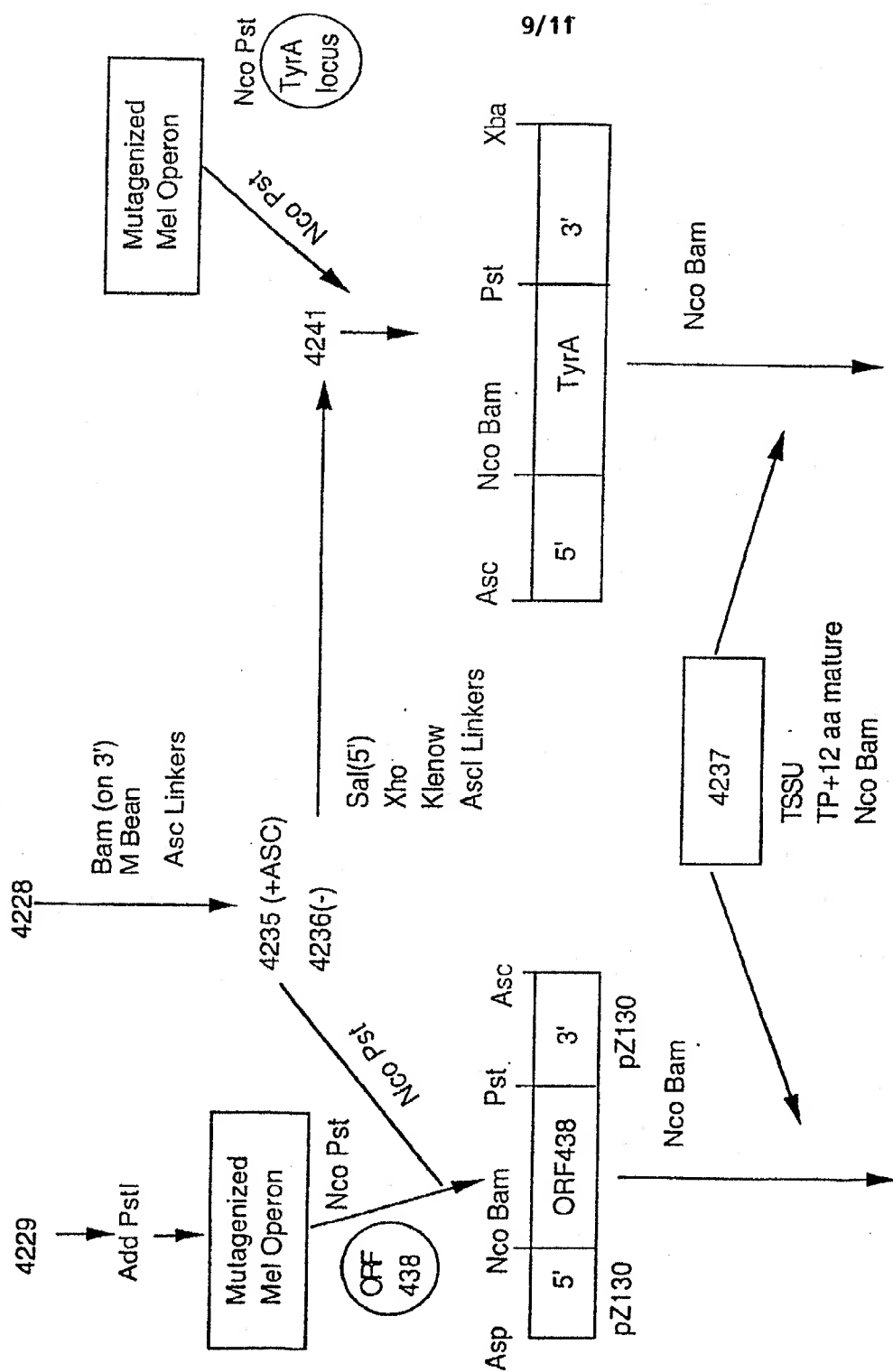


FIG. 7A

10/11

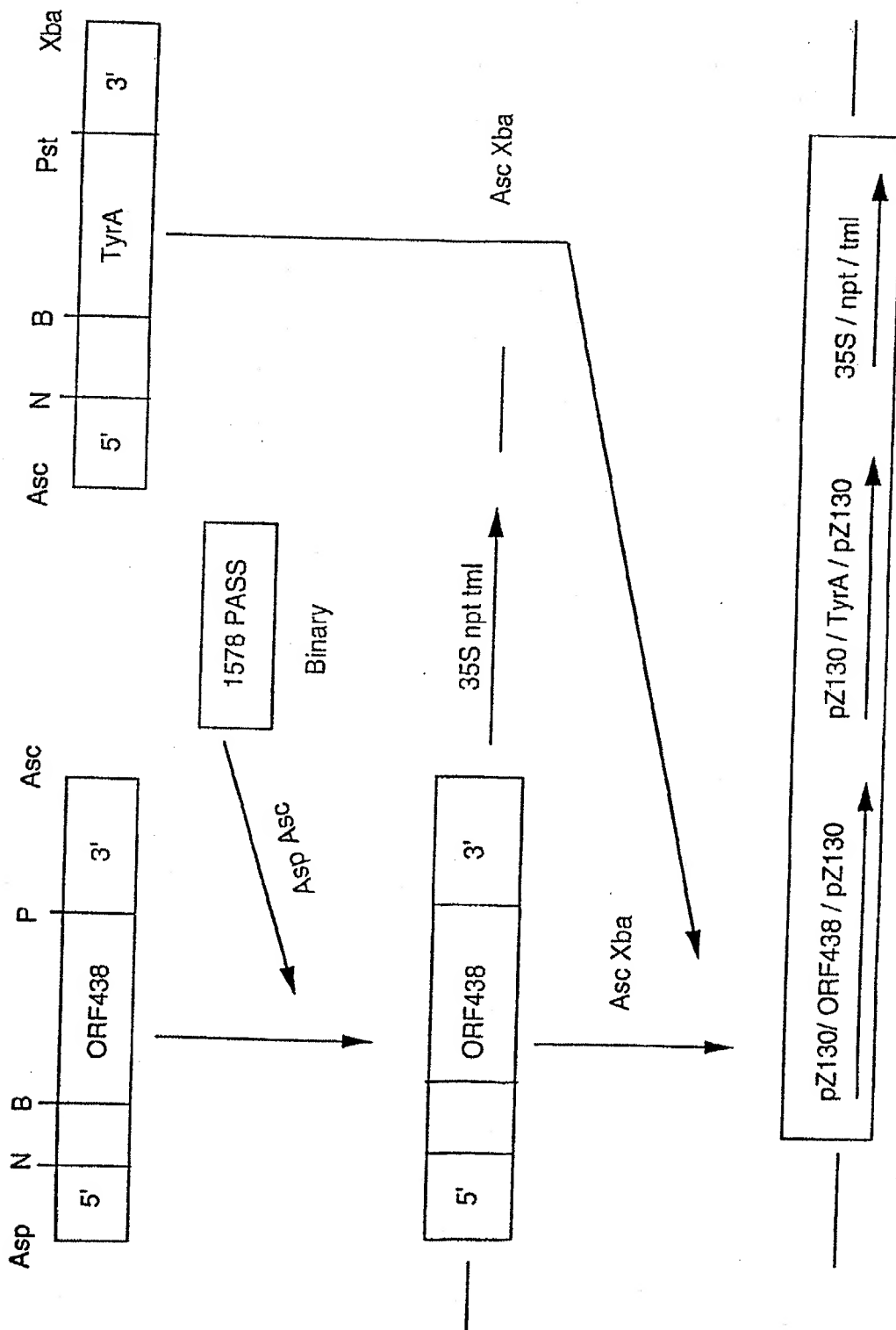


FIG. 7B

11/11

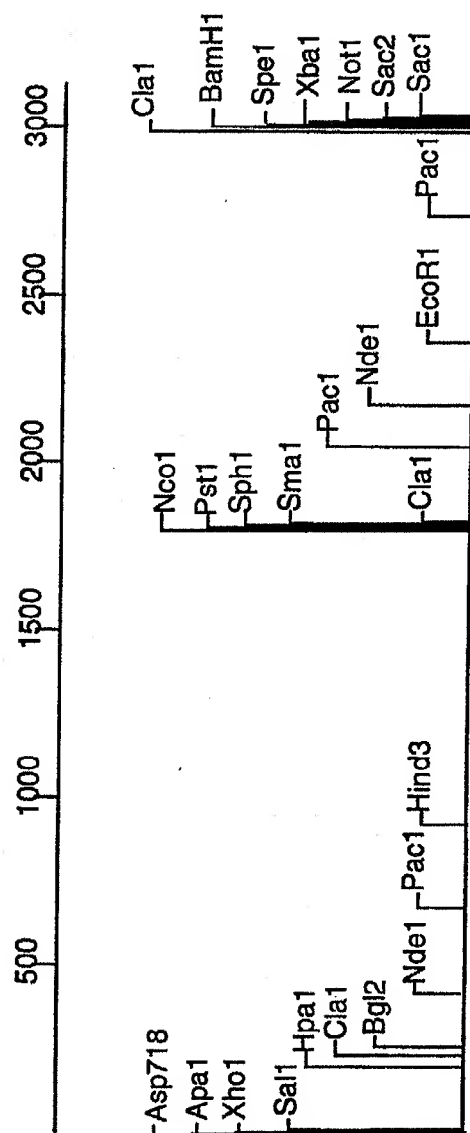


FIGURE 8